**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Características hematológicas de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*,
Holmberg, 1887) submetidos a condições adversas e alimentados com
coloostro bovino**

Jessica Pampolini

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra
em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e
Pastagens

**Piracicaba
2017**

Jessica Pampolini
Bióloga

**Características hematológicas de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*,
Holmberg, 1887) submetidos a condições adversas e alimentados com colostro
bovino**

Orientador:
Prof. Dr. **RAUL MACHADO NETO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra
em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e
Pastagens

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Pampolini, Jessica

Características hematológicas de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) submetidos a condições adversas e alimentados com colostro bovino / Jessica Pampolini. -- Piracicaba, 2017.

69 p.

Dissertação (Mestrado) -- USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Teleósteos 2. Células de proteção do sangue 3. Densidade populacional 4. Hipóxia I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pela vida, pela oportunidade que me deram de estar aqui, evoluindo. Pelo apoio, pelo amor, pelo carinho, pela amizade, por acreditarem em mim sempre. Pelo grande exemplo de dedicação, seriedade, perseverança, responsabilidade e humildade.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, a Deus, pelo dom da vida e pelas oportunidades de evolução.

Aos meus pais, por todo o apoio, dedicação, carinho, paciência e principalmente pelo amor que sempre me dão.

Ao meu irmão Augusto, pela amizade e apoio.

À minha querida avó Maria, pelo carinho, amor, doçura e por suas orações.

Aos meus tios, tias, primos e primas pelo carinho, apoio e amizade.

Aos amigos da Pró-Vida, pela amizade e ensinamentos.

À Jéssica Calderan, pela amizade, paciência e apoio que sempre me dá.

Aos membros do Laboratório de Anatomia e Fisiologia Animal (LAFa), especialmente à Debora B. Moretti, Wiolene M. Nordi, Mariana F. Pontin, Nathália Aguiar e Caroline Rodrigues, pelo apoio, companheirismo e troca de conhecimentos.

Ao Professor Dr. Raul Machado Neto, pelo acolhimento, apoio, amizade, ensinamentos e pela troca de conhecimentos.

Aos amigos do Laboratório de Anatomia de Plantas Forrageiras (LAPF), em especial à Solange G. Holschuch, Patrícia L. Barbosa e Larissa Garcia, pela amizade, carinho, apoio e também pelos cafezinhos.

Aos membros e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens, pelo companheirismo e apoio.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) por toda a estrutura oferecida durante meu período de pós-graduação.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação da ESALQ/USP, pela dedicação e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos membros do Setor de Piscicultura da ESALQ/USP, pelo espaço cedido e por todo apoio e amizade durante a parte experimental a campo.

Ao João Fernando Albers Koch, pelo apoio, amizade e conhecimentos transmitidos durante meu projeto de pesquisa.

À Thaline Pachelli, pela amizade, apoio e carinho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro.

À Universidade de São Paulo, pela oportunidade de ser aluna de graduação e de mestrado nesta brilhante instituição de ensino.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização de meu Programa de Pós-Graduação.

Meus sinceros agradecimentos.

EPÍGRAFE

*“Um pouco de ciência nos afasta de Deus,
Muito, nos aproxima. ”*

Louis Pasteur

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE TABELAS	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1. EXPERIMENTOS DE CAMPO	17
2.2. ANÁLISES HEMATOLÓGICAS	22
2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
3. RESULTADOS	25
3.1. EXPERIMENTO DE ESTRESSE CRÔNICO – ELEVADA DENSIDADE DE ESTOCAGEM	25
3.2. EXPERIMENTO DE ESTRESSE AGUDO - BAIXA OXIGENAÇÃO	29
4. DISCUSSÃO	35
REFERÊNCIAS	39
ANEXOS	51

RESUMO

Características hematológicas de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) submetidos a condições adversas e alimentados com colostro bovino

Foram avaliadas as características hematológicas, mais especificamente a resposta dos elementos de proteção do sangue, de juvenis de pacu, espécie endêmica e neotropical, mantidos em condições adversas e alimentados com dietas contendo colostro bovino liofilizado. Esta primeira secreção láctea, rica fonte de proteínas, moléculas biologicamente ativas e elementos antioxidantes, pode atuar positivamente no sistema de proteção dos animais. No experimento de estresse crônico, juvenis de pacu foram alocados em elevada densidade (50 kg peixe/m³) por 30 dias. No experimento de estresse agudo, os juvenis permaneceram por 15 dias em gaiolas de alimentação, sendo submetidos à baixa concentração de oxigênio (0,75 mg/L). Durante o período experimental, quatro dietas contendo 0, 10, 20 e 30% de colostro bovino liofilizado (CBL) (com 32% de proteína bruta), foram fornecidas duas vezes diariamente (considerando-se quadruplicatas para cada dieta). Antes do início e ao final de cada experimento, analisou-se para cada lote os parâmetros biométricos de biomassa e comprimento para obtenção de análises de desempenho. Oito juvenis para a situação experimental de adensamento, e dez juvenis para a de hipóxia, de cada tratamento, foram anestesiados com benzocaína e amostras de sangue foram coletadas do vaso caudal para análises hematológicas. Foram realizadas análises de eritrograma, leucograma (contagem total e diferencial de leucócitos), hematócrito e calculados os índices hematimétricos. As imunoglobulinas séricas dos juvenis de pacu foram quantificadas através do método de Turvação por Sulfato de Zinco (ZST), que foi padronizado para peixes no presente trabalho. Os juvenis de pacu foram distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado no experimento de estresse crônico, e para o de estresse agudo, em blocos, ambos com quatro tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância, através do procedimento “General Linear Model” (PROC GLM) do programa estatístico SAS (1989). Para a avaliação de diferenças entre médias foram efetuados contrastes entre pares de médias utilizando-se o método de Tukey, onde foi considerada a probabilidade de 5% ($P < 0,05$). Não foi observada influência do colostro bovino no desempenho e nas variáveis hematológicas analisadas em ambas situações experimentais, estresse crônico e agudo. Entretanto, para o experimento de estresse agudo, a inclusão de CBL na dieta dos pacus influenciou o número de células granulocíticas especiais, sendo que o grupo que recebeu 0% de CBL apresentou menor número de células que o grupo que recebeu 10% de CBL, assim como o número de monócitos, sendo que o grupo que recebeu 20% de CBL apresentou menor número de células que o grupo que recebeu 30% de CBL na dieta ($P < 0,05$). Embora o colostro bovino não tenha influenciado as variáveis hematológicas analisadas, não houve efeito negativo à esta fonte de proteína heteróloga fornecida aos peixes, uma vez que o desempenho dos animais que receberam o composto na dieta foi semelhante aos animais que receberam dieta sem esta secreção láctea. Considerando os presentes resultados, o colostro bovino liofilizado, uma fonte rica de moléculas bioativas, não contribuiu para a proteção de juvenis de pacu sujeitos à alta densidade de estocagem e baixa oxigenação.

Palavras-chave: Teleósteos; Secreção láctea; Índices hematimétricos; Desempenho; Hipóxia; Densidade populacional

ABSTRACT

Hematological characteristics of pacu juveniles (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) submitted to high density storage and fed with bovine colostrum

Hematological characteristics were evaluated, specifically the response of blood protection elements of juvenile pacu, endemic and neotropical species, kept under adverse conditions and fed diets containing lyophilized bovine colostrum. This first milk secretion, a rich protein source, biologically active molecules and antioxidant elements, can act positively in the animal protection system. In the chronic stress experiment, juvenile pacu were allocated at high density (50 kg fish/m³) for 30 days. In the acute stress experiment, the juveniles remained for 15 days in feed cages and were submitted to low oxygen concentration (0.75 mg/L). During the experimental period, four diets containing 0, 10, 20 and 30% of lyophilized bovine colostrum (CBL) (with 32% crude protein) were given twice daily (considering quadruplicates for each diet). Before the beginning and the end of each experiment, the biometric parameters of biomass and length were analyzed in each batch for performance analyses. Eight juveniles for the experimental situation of densification and ten juveniles for hypoxia of each treatment were anesthetized with benzocaine and blood samples were collected from the caudal vein for the hematological analysis. Erythrogram, leukogram (total and differential counts of leukocytes), hematocrit and hematimetric indexes were performed. The serum immunoglobulins of the pacu juveniles were quantified by the Zinc Sulfate Turbid (ZST) method, which was standardized for fish in this study. Juveniles pacu were distributed in a completely randomized experimental design for chronic stress experiment, and for acute stress in randomized blocks, both with four treatments. Data were submitted to the “General Linear Model” procedure (PROC GLM) of the statistical program SAS (1989). For a mean-to-average assessment, contrasts were performed between pairs of means using the Tukey method, where a probability of 5% ($P < 0.05$) was considered. No influence of bovine colostrum was observed on performance and hematological variables analyzed in both experimental situations, chronic and acute stress. However, for the experimental situation of acute stress, the addition of CBL to the diet of pacu influenced the number of special granulocytic cells, and the group that received 0% CBL presented lower number of cells than the group that received 10% CBL, as well as the number of monocytes. The group that received 20% of CBL presented lower number of monocytes than the group that received 30% of CBL in the diet ($P < 0.05$). Although bovine colostrum did not influence the hematological variables analyzed, there was no negative effect on this source of heterologous protein supplied to the fish, since the performance of the animals that received the compound in the diet was similar to the animals that received diet without this milk secretion. Considering the results, lyophilized bovine colostrum, a rich source of bioactive molecules, does not contribute to the protection of juvenile pacu subjected to high stocking density and low oxygenation.

Keywords: Teleost; Milk secretion; Hematimetric indexes; Performance; Hypoxia; Population density

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. COMPOSIÇÃO BROMATOLÓGICA DO COLOSTRO BOVINO.	20
TABELA 2. COMPOSIÇÃO DAS DIETAS CONTENDO 0, 10, 20 E 30% DE INCLUSÃO DE COLOSTRO BOVINO LIOFILIZADO (CBL).	21
TABELA 3. PARÂMETROS DE DESEMPENHO DE JUVENIS DE PACU (<i>PIARACTUS MESOPOTAMICUS</i>) ALIMENTADOS COM 0, 10, 20 E 30% DE COLOSTRO BOVINO LIOFILIZADO E ADENSADOS A 50 KG/M ³ (MÉDIA±DESVIO PADRÃO).	25
TABELA 4. NÚMERO TOTAL DE ERITRÓCITOS (10 ⁶ /μL), PERCENTUAL DE HEMATÓCRITO (%) E TAXA DE HEMOGLOBINA (G/DL) DOS JUVENIS DE PACU (<i>PIARACTUS MESOPOTAMICUS</i>) ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO 0, 10, 20 OU 30% DE COLOSTRO BOVINO LIOFILIZADO E ADENSADOS A 50 KG/M ³ (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO).	26
TABELA 5. ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS: VOLUME VORPUSCULAR MÉDIO (VCM), HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA (HCM) E CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA (CHCM) DOS JUVENIS DE PACU (<i>PIARACTUS MESOPOTAMICUS</i>) ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO 0, 10, 20 OU 30% DE COLOSTRO BOVINO LIOFILIZADO E ADENSADOS A 50 KG/M ³ (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO).	27
TABELA 6. NÚMERO TOTAL DE LEUCÓCITOS, LINFÓCITOS, MONÓCITOS, NEUTRÓFILOS, CÉLULAS GRANULOCÍTICAS ESPECIAIS (CGES) E EOSINÓFILOS POR MICROLITRO DOS JUVENIS DE PACU (<i>PIARACTUS MESOPOTAMICUS</i>) ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO 0, 10, 20 OU 30% DE COLOSTRO BOVINO LIOFILIZADO E ADENSADOS A 50 KG/M ³ (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO).	28
TABELA 7. NÚMERO TOTAL DE TROMBÓCITOS DOS JUVENIS DE PACU (<i>PIARACTUS MESOPOTAMICUS</i>) ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO 0, 10, 20 OU 30% DE COLOSTRO BOVINO LIOFILIZADO E ADENSADOS A 50 KG/M ³ (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO).	29
TABELA 8. VALOR ZST CORRESPONDENTE À QUANTIDADE DE IMUNOGLOBULINAS SÉRICAS DOS JUVENIS DE PACU (<i>PIARACTUS MESOPOTAMICUS</i>) ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO 0, 10, 20 OU 30% DE COLOSTRO BOVINO LIOFILIZADO E ADENSADOS A 50 KG/M ³ (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO).	29
TABELA 9. PARÂMETROS DE DESEMPENHO DE JUVENIS DE PACU (<i>PIARACTUS MESOPOTAMICUS</i>) ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO 0, 10, 20 OU 30% DE COLOSTRO BOVINO LIOFILIZADO E MANTIDOS SOB BAIXA OXIGENAÇÃO (0,75 MG/L) (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO).	30
TABELA 10. NÚMERO TOTAL DE ERITRÓCITOS (10 ⁶ /μL), PERCENTUAL DE HEMATÓCRITO (%) E TAXA DE HEMOGLOBINA DOS JUVENIS DE PACU (<i>PIARACTUS MESOPOTAMICUS</i>) ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO 0, 10, 20 OU 30% DE COLOSTRO BOVINO LIOFILIZADO E MANTIDOS SOB BAIXA OXIGENAÇÃO (0,75MG/L) (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO).	31
TABELA 11. ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS: VOLUME CORPUSCULAR MÉDIO (VCM), HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA (HCM) E CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA CORPUSCULAR MÉDIA (CHCM) DOS JUVENIS DE PACU (<i>PIARACTUS MESOPOTAMICUS</i>) ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO 0, 10, 20 OU 30% DE COLOSTRO BOVINO LIOFILIZADO E MANTIDOS SOB BAIXA OXIGENAÇÃO (0,75 MG/L) (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO).	32
TABELA 12. NÚMERO TOTAL DE LEUCÓCITOS (μL (X10 ³)), LINFÓCITOS, MONÓCITOS, NEUTRÓFILOS, CÉLULAS GRANULOCÍTICAS ESPECIAIS (CGES) E EOSINÓFILOS DOS JUVENIS DE PACU (<i>PIARACTUS MESOPOTAMICUS</i>) ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO 0, 10, 20 OU 30% DE COLOSTRO BOVINO LIOFILIZADO E MANTIDOS SOB BAIXA OXIGENAÇÃO (0,75 MG/L) (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO).	33
TABELA 13. NÚMERO TOTAL DE TROMBÓCITOS (μL (X10 ³) DOS JUVENIS DE PACU (<i>PIARACTUS MESOPOTAMICUS</i>) ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO 0, 10, 20 OU 30% DE COLOSTRO BOVINO LIOFILIZADO E MANTIDOS SOB BAIXA OXIGENAÇÃO (0,75 MG/L) (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO).	34

TABELA 14. VALOR ZST CORRESPONDENTE À QUANTIDADE DE IMUNOGLOBULINAS SÉRICAS DOS JUVENIS DE PACU (<i>PIARACTUS MESOPOTAMICUS</i>) ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO 0, 10, 20 OU 30% DE COLOSTRO BOVINO LIOFILIZADO E MANTIDOS SOB BAIXA OXIGENAÇÃO (0,75 MG/L) (MÉDIA $\pm$ DESVIO PADRÃO).	34

1. INTRODUÇÃO

A contribuição da piscicultura para a produção mundial de pescados aumentou significativamente ao longo das últimas décadas. Em 2014, o setor produziu cerca de 49,8 milhões de toneladas de peixe, fornecendo quase metade do total produzido pela indústria pesqueira neste ano (93,4 milhões de toneladas) (FAO, 2017). Neste contexto, a piscicultura é uma atividade que vem sendo bastante valorizada no Brasil, sendo que as condições hídricas e climáticas do país possibilitam a criação de diversas espécies de peixes (Valenti et al., 2000; Ostrensky et al., 2008). Entretanto, a piscicultura no país ainda apresenta resultados modestos de desenvolvimento, em razão dos processos de produção adotados e da falta de informações sobre as espécies nativas com potencial zootécnico. Assim, reveste-se de relevância o estudo e desenvolvimento de técnicas e alternativas que viabilizem a produção dessas espécies em larga escala, assim como, estudos sobre as características fisiológicas dos animais que permitam proporcionar higidez a essas espécies (Beerli et al., 2004).

O pacu, espécie Characiforme endêmica e neotropical, além de possuir carne branca de excelente qualidade, apresenta atributos favoráveis para a criação em sistemas comerciais, como crescimento rápido, eficiente conversão alimentar, adaptabilidade aos ecossistemas artificiais e grande aceitação e valorização no mercado nacional. Em razão destas características, a espécie vem sendo cada vez mais produzida de forma intensiva (Jomori et al., 2003; Sampaio-Oliveira et al., 2004; Crescêncio, 2005; Urbinati, 2005).

Com a intensificação da produção das espécies com potencial para a piscicultura, os problemas de ordem sanitária se tornaram recorrentes. O frequente manejo e variações ambientais, além do adensamento populacional, podem provocar um estado de estresse crônico nos peixes, condição que pode romper o equilíbrio homeostático, afetando seu sistema imune e aumentando a susceptibilidade a enfermidades, sendo necessário o constante monitoramento das condições de higidez das espécies em criação (Colt, 1991; Tort et al., 1996; Schep et al., 1999; Pavanelli et al., 2000; Davis, 2002; Ozório et al., 2004; Urbinati e Carneiro, 2004; Val et al., 2004). Neste sentido, o conhecimento das características hematológicas e imunológicas das espécies com potencial para criação desempenha importante papel, atuando como ferramenta de avaliação de defesas fisiológicas, permitindo ao pesquisador identificar as respostas dos peixes frente aos desafios de criação de forma eficaz (Ranzani-Paiva et al., 2013) e formular dietas que possam minimizar estes efeitos negativos causados pelo estresse.

Em seu habitat natural, os peixes estão em constante interação com o meio envolvente e, conseqüentemente, em contato com potenciais patógenos. Para proteção contra estes patógenos e para a manutenção da higidez, os peixes contam naturalmente com a ação de um sistema imunológico que os protege do ataque, invasão ou multiplicação de microrganismos nos tecidos (Ellis, 2001). As barreiras superficiais são os primeiros mecanismos de defesa dos peixes. O tegumento confere proteção física ao ataque e penetração de microrganismos e o muco presente nessa barreira, além de reter fisicamente estes possíveis invasores, confere proteção química, pois contém várias substâncias antibacterianas, como peptídeos antibacterianos, lisozimas, lectinas e proteases (Demers e Bayne, 1997).

As barreiras superficiais nem sempre são suficientes para proteção contra o ataque de microrganismos e quando os invasores as ultrapassam e ganham acesso aos tecidos, são recebidos com uma variedade de defesas presentes no sangue (Endo et al., 1998; Magnadottir et al., 2005; Nonaka e Smith, 2000). O plasma sanguíneo contém vários fatores que agem inibindo o crescimento bacteriano, como transferrinas e anti-proteases, ou como bactericidas, como a lisozima (Nonaka e Smith, 2000; Zarkadis et al., 2002). Também apresenta defesas antivirais, caracterizadas pela ação de células citotóxicas não específicas em células infectadas por vírus, pela ação de lectinas e lisinas, que podem atacar a superfície destas células infectadas, e de interferons, que inibem a tradução do RNA viral (Robertsen, 1999). O sistema complemento, também presente no plasma sanguíneo atua na quimiotaxia, opsonização e lise de células bacterianas. Além disso, quando seus componentes são ativados por constituintes bacterianos, por lectinas ou por proteínas C-reativas podem atuar na indução do fluxo e atividade de fagócitos (Fast et al., 2002; Holland e Lambris, 2002; Morgan et al., 2005).

As células do sistema imune dos peixes são os glóbulos brancos circulantes, que possuem semelhanças morfológicas e funcionais com as dos mamíferos (Zelikoff, 1998). As respostas imunes iniciadas após a invasão de um microrganismo patogênico culminarão na fagocitose e em processos inflamatórios (Corbel, 1975), que serão auxiliados por células de defesa, tais como monócitos/macrófagos, heterófilos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos heterófilos e célula granulocítica especial (CGE) ou leucócito granular PAS-positivo (LG-PAS) (Secombes, 1997). Os peixes também apresentam células responsáveis pela coagulação sanguínea, os trombócitos, que protegem estes animais contra hemorragia. Estas células dos peixes são funcionalmente equivalentes às plaquetas dos mamíferos (Tavares-Dias e Moraes, 2004), mas possuem, diferencialmente, função fagocitária direcionada à remoção de debris

celulares, além da habilidade de migração para o foco inflamatório (Matushima e Mariano, 1996; Tavares-Dias et al., 2006b).

Além das defesas inatas, os peixes também possuem a resposta imune adaptativa, caracterizada pela presença de imunoglobulinas (Igs), Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) e linfócitos T e B (Secombes e Ellis, 2012). Os linfócitos são os leucócitos mais abundantes na corrente sanguínea dos peixes, sendo responsáveis pelo reconhecimento de antígenos e pela resposta imune adaptativa. Nos peixes podem ser encontrados linfócitos Natural Killers (NK), linfócitos T auxiliares (T helpers (Th)), linfócitos T citotóxicos (Tc), linfócitos T de memória, células T naïve e subpopulações de células B, sendo estas últimas responsáveis pela produção das imunoglobulinas e pela formação da memória imunológica (Kaattari, 1992; Miller et al., 1998; Scapigliati et al., 1999; Laing e Hansen, 2011). A imunoglobulina M (IgM), é a principal classe de imunoglobulina descrita em peixes, possui forma predominantemente tetrâmera, mas pode apresentar isoformas diferentes, como pentâmera, hexâmera e monômera (Tort et al., 1998). Recentemente, duas novas classes de imunoglobulinas foram descritas para alguns peixes teleósteos, a imunoglobulina D (IgD) (Edholm et al., 2010a) e a imunoglobulina T (IgT), também denominada como imunoglobulina Z (IgZ) (Danilova et al., 2005; Hansen et al., 2005), estando esta última relacionada com a imunidade intestinal (Zhang et al., 2010).

O estresse representa uma condição causada por um estressor que pode determinar alterações na homeostase do animal, e a resposta fisiológica e comportamental à situação estressante é denominada resposta ao estresse (Chrousos e Gold, 1992; Iwama, 1998). Há dois tipos de estresse, o agudo e o crônico, que podem levar a diferentes respostas fisiológicas que permitirão ao animal superar a situação adversa. O estresse agudo gera respostas que causam um efeito extremamente imunossupressor, levando a grandes perdas por doenças. Já o estresse crônico, que acontece quando os animais são mantidos por um longo período de tempo em situações inadequadas, como pH incorreto, baixa oxigenação e superpopulação, pode levar à redução, ou até mesmo inibição do crescimento, falha reprodutiva e resistência reduzida a agentes patogênicos (Bonga, 1997; Iwama, 1998). A resposta ao estresse pode envolver modificações na composição do sangue e nos mecanismos imunológicos, como distúrbios osmóticos, aumento das concentrações de substrato energético, aumento da atividade de certas enzimas e diminuição de fatores imunes humorais (Bonga, 1997). Além disso, o estresse também induz a mudanças no número e atividade das células sanguíneas. Com relação aos eritrócitos, o estresse leva a um aumento do hematócrito e do nível de hemoglobina e para os

leucócitos, uma diminuição do número de células, linfócitos e fagócitos, também podendo prejudicar a atividade destas células (Fletcher, 1975; Houston et al. 1996).

A dieta, como verificado em várias espécies animais, também pode influenciar na produção de anticorpos e na quantidade sérica de elementos de defesa, como na quantidade de leucócitos, podendo alterar a capacidade do animal a resistir a doenças infecciosas (Alcorn et al., 2013; Blazer, 1991; Landolt, 1989). Muitas substâncias possuem influência sob o sistema imunológico e podem ser utilizadas como moduladores deste sistema (Harris e Bird, 2000). Nos últimos anos, o uso de antibióticos tem sido criticado em razão de seus impactos negativos sobre o ambiente, bem como aos peixes. Assim, várias substâncias têm sido utilizadas na piscicultura como tratamentos alternativos, aditivos ou suplementos alimentares com o objetivo de melhorar o desempenho e a sanidade dos animais. Dentre estas, pode-se citar os probióticos, prebióticos, imunomoduladores, imunonutrientes e imunoestimulantes, compostos conhecidos por diminuir a susceptibilidade dos animais às enfermidades (Verschuere et al. 2000; Nikoskelainen et al. 2001; Nayak, 2010).

O colostro bovino é a primeira secreção láctea após o parto dos mamíferos e desempenha um papel importante na saúde do neonato. Além das imunoglobulinas, responsáveis pela proteção inicial de boa parte dos mamíferos, é uma rica fonte de proteínas, gorduras, carboidratos, vitaminas e minerais. Apresenta grandes concentrações de fatores de crescimento, moléculas biologicamente ativas responsáveis pela promoção do crescimento e desenvolvimento do recém-nascido, bem como dos fatores antimicrobianos, que fornecem proteção contra infecções durante as primeiras semanas de vida (Brambell, 1957; Jeffcot, 1972; Campbell et al., 1977; Boudry & Thewis, 2009; Pandey et al. 2011). Em razão destas características, o colostro bovino tem sido utilizado como fonte imunológica e nutricional para várias espécies, como caprinos, ovinos, suínos, roedores e peixes (Huguet et al., 2006; Lima et al., 2009; Moretti et al., 2010a; Moretti et al., 2010b; Rodrigues et al., 2010; Bodammer et al., 2011). Além disso, o colostro possui uma elevada capacidade antioxidante, uma vez que é rico em antioxidantes enzimáticos, como lactoperoxidase, catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, e não enzimáticos, como vitamina A, C, E, lactoferrina, selênio, cobre, zinco, cisteína, entre outros. Vale ressaltar que esses elementos antioxidantes atuam na imunidade do animal, através da proteção das células imunes contra danos oxidativos, melhorando a eficiência funcional dessas células (Pandey, 2011). Autores trabalhando com a adição de lactoferrina bovina na dieta de peixes obtiveram significativo aumento na resistência

ao estresse, uma vez que a substância melhorou a atividade de fagócitos (Sakai et al., 1993; Kakuta et al. 1998).

Nesta perspectiva, o colostro bovino, sendo uma rica fonte de moléculas biologicamente ativas, quando adicionado na dieta de peixes pode influenciar positivamente na resistência destes animais ao estresse, podendo aumentar sua capacidade imune. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta dos elementos de proteção do sangue em juvenis de pacu, mantidos em elevada densidade de estocagem e sob condição de baixa oxigenação, condições promotoras de estresse, alimentados com dietas contendo colostro bovino liofilizado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Experimentos de Campo

2.1.1. Experimento de Estresse Crônico - Elevada Densidade de Estocagem

Juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) condicionados a aceitar alimentação artificial, foram estocados por 30 dias em elevada densidade (50 kg peixe/m³), segundo Merloza e Souza (1988). Durante todo o período experimental, quatro dietas contendo 0, 10, 20 e 30% de colostro bovino liofilizado (CBL) (com 32% de proteína bruta), foram fornecidas duas vezes (8:00, 16:00) diariamente (considerando-se quadruplicatas para cada dieta). Os juvenis permaneceram em gaiolas de alimentação, constituídas de tanques de plástico retangulares com volume de 32 litros, dotados de fluxo de água e aeração contínuos em sistema de circulação fechada, em condições controladas de temperatura e luminosidade (24± 1°C e fotoperíodo de 12 horas). Os parâmetros de qualidade da água foram monitorados constantemente e mantiveram-se adequados: pH (8,4±0,3) e porcentagem de oxigênio dissolvido na água (57,3±,7,4%). Antes do início do experimento e após 30 dias de período experimental, analisou-se para cada lote os parâmetros biométricos de biomassa e comprimento para obtenção de análises de desempenho. Os seguintes parâmetros de desempenho foram considerados:

- Ganho de peso (GP) (g)

$$GP = \text{biomassa final (g)} - \text{biomassa inicial (g)}$$

- Ganho de Peso Relativo (GPR) (%)

$$GPR = \frac{\text{biomassa final (g)} - \text{biomassa inicial (g)}}{\text{biomassa inicial (g)}} \times 100$$

- Taxa de Crescimento Específico (TCE)

$$TCE = \frac{\ln \text{biomassa final (g)} - \ln \text{biomassa inicial (g)}}{\text{dias experimento}} \times 100$$

- Conversão Alimentar (kg·kg⁻¹) (CA)

$$CA = \frac{\text{ingestão}}{\text{ganho de peso}}$$

- Sobrevivência (%) (S)

$$S = \frac{\text{nº de animais final}}{\text{nº de animais inicial}} \times 100$$

Aos 30 dias de período experimental, os juvenis foram submetidos à restrição alimentar por um período anterior de 24 horas e oito juvenis de cada tratamento foram selecionados e anestesiados com benzocaína (1g/20L de água). Amostras de sangue foram coletadas do vaso caudal, para posteriores análises hematológicas. Todos os procedimentos realizados durante o projeto de pesquisa foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), protocolo nº 2015-13.

2.1.2. Experimento de Estresse Agudo - Baixa Oxigenação

Juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) foram estocados por 15 dias em gaiolas de plástico retangulares com volume de 40 litros, contidos em cinco tanques com 1000 litros cada. Cada tanque era constituído de quatro gaiolas com seis animais cada, cada uma recebendo um dos quatro tratamentos (0, 10, 20 e 30% de CBL), que foram fornecidos duas vezes (8:00, 16:00) diariamente. Cada tanque constituía, assim, um bloco aleatório. Os parâmetros de qualidade da água foram monitorados constantemente e mantiveram-se adequados: pH (8,1±0,3) e porcentagem de oxigênio dissolvido na água (63,8±10,7%). Antes do início do experimento e após 15 dias de período experimental, analisou-se para cada lote os parâmetros biométricos de biomassa e comprimento para obtenção de análises de desempenho. Os seguintes parâmetros de desempenho foram considerados:

- Ganho de peso (GP) (g)

$$GP = \text{biomassa final (g)} - \text{biomassa inicial (g)}$$

- Ganho de peso relativo (GPR) (%)

$$GPR = \frac{\text{biomassa final (g)} - \text{biomassa inicial (g)}}{\text{biomassa inicial (g)}} \times 100$$

- Taxa de Crescimento Específico (TCE)

$$TCE = \frac{\ln \text{biomassa final (g)} - \ln \text{biomassa inicial (g)}}{\text{dias experimento}} \times 100$$

- Conversão Alimentar (kg·kg⁻¹) (CA)

$$CA = \frac{\text{ingestão}}{\text{ganho de peso}}$$

- Sobrevivência (%) (S)

$$S = \frac{\text{nº de animais final}}{\text{nº de animais inicial}} \times 100$$

Aos 15 dias de período experimental, os juvenis foram submetidos à restrição alimentar por um período de 24 horas. O teor de oxigênio dissolvido na água foi reduzido gradualmente até o valor de 0,75 mg/L d'água, momento em que foi observado o “boquejamento” dos juvenis, comportamento que demonstra deficiência fisiológica de oxigenação. Após o período de uma hora, dez juvenis de cada tratamento, foram anestesiados com benzocaína (1g/20L de água) e amostras de sangue foram coletadas do vaso caudal para posteriores análises laboratoriais. Todos os procedimentos realizados durante o projeto de pesquisa foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), protocolo nº 2016-08.

2.1.3. Dietas experimentais

Quatro dietas experimentais isonitrogenadas (32% de proteína bruta) e isoenergéticas (4.000 kcal kg⁻¹) foram formuladas utilizando 0, 10, 20 e 30% de colostro bovino liofilizado (CBL). Para o cálculo das dietas utilizou-se a “planilha de formulação de rações para tilápia do nilo” segundo Pezzato e Silva (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Campus de Botucatu – UNESP) (Tabela 2). O colostro bovino foi coletado, homogeneizado, congelado a -20°C e, então, liofilizado no Laboratório de Bioquímica e Análise Experimental, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN), ESALQ/USP. O produto obtido foi armazenado a -20°C até inclusão nas dietas. A composição bromatológica do colostro foi determinada para a formulação das rações (Tabela 1).

Tabela 1. Composição bromatológica do colostro bovino.

	Matéria Original	Matéria Seca
Matéria Seca (%)	91,02	-
Proteína (%)	31,28	34,36
Extrato Etéreo (%)	5,59	6,14
Fibra Bruta (%)	0,77	0,85
Energia Bruta (caloria/g)	4.025	4.422,11

Tabela 2. Composição das dietas contendo 0, 10, 20 e 30% de inclusão de colostro bovino liofilizado (CBL).

Ingredientes (%)	Dieta¹			
	0%CBL	10%CBL	20%CBL	30%CBL
Albumina	20,2	18,35	12	5,82
Gelatina	15	9,47	7,9	6
Colostro	-	10	20	30
Amido	46,58	45,65	43,5	42,5
Óleo de soja	8	5,3	3,7	1,4
Fosfato bicálcico	4	3,17	4,75	5,94
Celulose	6	6,9	6,9	7
Triptofano	-	0,04	0,13	0,22
BHT	0,02	0,02	0,02	0,02
Vitamina C	0	0	0	0
Premix vit/min ²	1	1	1	1
NaCl	0,1	0,1	0,1	0,1
Informações Nutricionais				
Matéria seca (%)	82	85	87	90
Energia bruta (kcal kg ⁻¹)	3.967	3.974	4.010	4.019
Proteína bruta (%)	32	32	32	32
Fibra bruta (%)	5	5	5	5
Extrato etéreo (%)	8	6	6	5

OBS: ¹0% CBL = ração contendo 0% de colostro bovino liofilizado; 10% CBL = ração contendo 10% de colostro bovino liofilizado; 20% CBL = ração contendo 20% de colostro bovino liofilizado; 30% CBL = ração contendo 30% de colostro bovino liofilizado. ²Guabi Nutrição Animal, Campinas, SP, suplementação de Premix vitamínico mineral por quilograma de ração: 2.500.000 UI de vitamina A; 600.000 UI de vitamina D3; 37.500 UI de vitamina E; 3.750 mg de vitamina K3; 50.000 mg de vitamina C; 4.000 mg de vitamina B1; 4.000 mg de vitamina B2; 4.000 mg de vitamina B6; 4.000 mcg de vitamina B12; 12.000 mg de pantetonato de cálcio; 15 mg de biotina; 1.250 mg de ácido fólico; 22.500 mg de niacina; 2.500 mg de cobre; 12.500 mg de zinco; 375 mg de iodo; 87,5 mg de selênio; 125 mg de cobalto; 12.500 mg de manganês; 15.000 mg de ferro; 15.000 mg de BHT;

2.2. Análises hematológicas

O perfil hematológico dos juvenis de pacu, para ambas as situações experimentais, foi feito através de punção do vaso caudal utilizando seringas plásticas descartáveis de 3 mL previamente umedecidas com solução de ácido etilenodiaminotetraacético dissódico (Na_2EDTA) (3%). Foram avaliados os índices hematimétricos absolutos e suas variáveis, contagem diferencial de leucócitos, contagem total de leucócitos e trombócitos e dosagem das imunoglobulinas séricas. Todas as análises relacionadas à hematologia seguiram procedimentos descritos por Ranzani-Paiva et al. (2013), exceto para a dosagem de imunoglobulinas séricas.

2.2.1. Eritrograma

Aliquotas de sangue foram diluídas em tubos de ensaio na proporção 0,01 mL de sangue para 2,0 mL de solução formol citrato de sódio (1:200). A contagem de células vermelhas foi feita em câmara de Neubauer em microscópio óptico. O resultado foi expresso em número de eritrócitos/ μL .

2.2.1.1. Hematócrito

Para determinação do valor de hematócrito, amostras sanguíneas foram homogeneizadas e introduzidas em capilares para micro-hematócrito, onde uma das extremidades do capilar foi selada. Os capilares foram centrifugados em centrífuga de microhematócrito e a leitura foi feita com auxílio de tabela de microhematócrito e expressa como porcentagem de células vermelhas em relação ao sangue total.

2.2.1.2. Estimativa da Hemoglobina

A taxa de hemoglobina (Hb) foi determinada utilizando-se o kit comercial “Labtest”, através do método de cianeto de hemiglobina (HiCN), um sistema de reação colorimétrica de ponto final, onde a leitura foi feita em espectrofotômetro ajustado para 540 nm. O resultado foi expresso em g dL^{-1} .

2.2.1.3. Índices Hematimétricos

As variáveis hematimétricas como volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinadas segundo Wintrobe (1934) através dos seguintes cálculos:

$$\text{VCM} = \frac{\text{Htc} \times 10}{\text{Eri}}$$

$$\text{HCM (pg)} = \frac{\text{Hb} \times 10}{\text{Eri}}$$

$$\text{CHCM (g dL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Hb} \times 100}{\text{Hct}}$$

Sendo que: Htc = hematócrito; Eri = número total de eritrócitos; Hb = hemoglobina

2.2.2. Leucograma e Trombograma

A contagem total dos leucócitos e trombócitos foi realizada a partir de lâminas com extensões sanguíneas de cada animal, que foram secas ao ar e submetidas à coloração pelo método de Rosenfeld (1947) modificado, segundo Tavares-Dias e Moraes (2003), composto por eosina azul de metileno segundo May-Grunwald, eosina azul de metileno segundo Giemsa, eosina azul de metileno segundo Wrigth e metanol. As lâminas foram posteriormente analisadas em microscópio de luz e a contagem das células foi feita por método indireto a partir da seguinte fórmula (Martins et al., 2004):

$$\text{Leucócitos (por } \mu\text{L)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ leucócitos} \times \text{n}^\circ \text{ total de eritrócitos (por } \mu\text{L)}}{2000 \text{ eritrócitos contados na extensão sanguínea}}$$

$$\text{Trombócitos (por } \mu\text{L)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ trombócitos} \times \text{n}^\circ \text{ total de eritrócitos (por } \mu\text{L)}}{2000 \text{ eritrócitos contados na extensão sanguínea}}$$

A contagem diferencial das células de defesa foi realizada a partir das extensões sanguíneas de cada animal. Foram contadas 200 células para cada animal e o resultado foi expresso em porcentagem de cada tipo celular (linfócito, neutrófilo, monócito, eosinófilo e

célula granulocítica especial). Foi calculado o número absoluto de cada tipo celular com relação ao número total de leucócitos, que foi expresso em quantidade de células por μL de sangue.

2.2.3. Dosagem das imunoglobulinas séricas

Exploratoriamente, de forma inédita, as imunoglobulinas séricas foram estimadas através do método de Turvação por Sulfato de Zinco (ZST) (McEwan et al., 1970). Trata-se de um método que avalia a concentração de imunoglobulinas, macromoléculas de elevado peso molecular, através da leitura espectrofotométrica da turvação resultante da reação das imunoglobulinas com o sulfato de zinco. Para a realização desta técnica são adicionados 100 μL de soro das amostras em 6 mL de sulfato de zinco 0,02% ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Essa solução é, então, homogeneizada e, após 60 minutos de incubação, feita leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 660 nm. As leituras obtidas da absorbância são transformadas em unidades ZST multiplicando-se o valor obtido por 100.

Este método de avaliação de imunoglobulinas séricas foi anteriormente utilizado por nosso grupo em estudos com bovinos (Machado-Neto et al., 1989) e caprinos (Lima et al., 2009), mostrando-se bastante consistente. A correlação entre imunoglobulinas séricas e os valores ZST definida anteriormente foi de 1 unidade ZST para 1 mg/mL de imunoglobulina.

2.3. Análise Estatística

Para o experimento de estresse crônico, os juvenis de pacu foram distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro tratamentos. Para o experimento de estresse agudo, os juvenis de pacu foram distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado em blocos. Todos os dados foram submetidos à análise de variância, através do procedimento “General Linear Model” (PROC GLM) do programa estatístico SAS (1989). Para a avaliação de diferenças entre médias foram efetuados contrastes entre pares de médias utilizando-se o método de Tukey. Para todas as análises foi considerada a probabilidade de 5% ($P < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. Experimento de Estresse Crônico – Elevada Densidade de Estocagem

3.1.1. Parâmetros Zootécnicos

Os parâmetros de desempenho para os juvenis de pacu mantidos em elevada densidade de estocagem (50 kg/m³) alimentados com dietas contendo 0, 10, 20 ou 30% de colostro bovino liofilizado no período experimental estão apresentados na Tabela 3. Não houve diferença entre as dietas para os parâmetros de desempenho analisados ($P>0,05$).

Tabela 3. Parâmetros de desempenho de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com 0, 10, 20 e 30% de colostro bovino liofilizado e adensados a 50 kg/m³(média±desvio padrão).

Desempenho	Dieta ¹				P
	0% CBL	10% CBL	20% CBL	30% CBL	
Biomassa inicial (g)	1.604 ± 29	1.624 ± 21	1.604 ± 15	1.604 ± 39	N.S.
Biomassa final (g)	1.773 ± 52	1.783 ± 59	1.806 ± 42	1.785 ± 55	N.S.
Ganho de peso (g)	169 ± 46	159 ± 51	201 ± 49	181 ± 26	N.S.
Ganho de peso relativo (%)	11 ± 3	10 ± 3	13 ± 3	11 ± 2	N.S.
Consumo total (g)	533 ± 46	547 ± 60	538 ± 66	554 ± 54	N.S.
Conversão alimentar (CA)	3 ± 1	4 ± 1	3 ± 0,4	3 ± 0,2	N.S.
Taxa de crescimento específico (TCE) (%)	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	N.S.
Sobrevivência (S) (%)	100	100	100	100	

OBS.: ¹0%CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 0% de inclusão de colostro bovino liofilizado (CBL); 10% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 10% de inclusão de CBL; 20% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 20% de inclusão de CBL; 30% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 30% de inclusão de CBL; N.S. = $P>0,05$.

3.1.2. Parâmetros hematológicos

3.1.2.1. Eritrograma, hematócrito e estimativa de hemoglobina

O número total de eritrócitos, o percentual de hematócrito e a taxa de hemoglobina (g/dL) observados para os juvenis de pacu mantidos sob elevada densidade de estocagem e alimentados com dietas contendo 0, 10, 20 ou 30% de inclusão de colostro bovino liofilizado está representado na Tabela 4. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para o teste de Tukey ($P>0,05$).

Tabela 4. Número total de eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$), percentual de hematócrito (%) e taxa de hemoglobina (g/dL) dos juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com dietas contendo 0, 10, 20 ou 30% de colostro bovino liofilizado e adensados a 50 kg/m^3 (média $\pm$ desvio padrão).

Variável Analisada	Dieta ¹				P
	0% CBL	10% CBL	20% CBL	30% CBL	
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	1,8 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,2	N.S.
Hematócrito (%)	31,4 $\pm$ 2,5	33,4 $\pm$ 0,7	33 $\pm$ 1,4	32,9 $\pm$ 2,5	N.S.
Hemoglobina (g/dL)	7,8 $\pm$ 0,5	7,7 $\pm$ 0,2	7,7 $\pm$ 0,4	7,4 $\pm$ 0,2	N.S.

OBS.: ¹0% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 0% de inclusão de colostro bovino liofilizado (CBL); 10% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 10% de inclusão de CBL; 20% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 20% de inclusão de CBL; 30% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 30% de inclusão de CBL; N.S.= não significativo para o teste de Tukey ($P>0,05$).

3.1.2.2. Índices hematimétricos

Os valores dos índices hematimétricos observados para os juvenis de pacu mantidos sob elevada densidade de estocagem (50 kg/m^3) e alimentados com dietas contendo 0, 10, 20 ou 30% de colostro bovino estão representados na Tabela 5. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos ($P>0,05$).

Tabela 5. Índices hematimétricos: volume vörpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) dos juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com dietas contendo 0, 10, 20 ou 30% de colostro bovino liofilizado e adensados a 50 kg/m³ (média $\pm$ desvio padrão)

Variável Analisada	Dieta ¹				P
	0% CBL	10% CBL	20% CBL	30% CBL	
VCM (fL)	173,8 $\pm$ 13,4	170,2 $\pm$ 8,5	180,0 $\pm$ 17,3	175,5 $\pm$ 9,3	N.S.
HCM (pg/cel)	43,3 $\pm$ 4,5	39,2 $\pm$ 3,1	42,0 $\pm$ 5,0	40,0 $\pm$ 6,0	N.S.
CHCM (g/dL)	24,8 $\pm$ 1,3	23,0 $\pm$ 1,1	23,3 $\pm$ 0,7	20,6 $\pm$ 6,0	N.S.

OBS.: ¹0% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 0% de inclusão de colostro bovino liofilizado (CBL); 10% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 10% de inclusão de CBL; 20% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 20% de inclusão de CBL; 30% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 30% de inclusão de CBL; N.S.= não significativo para o teste de Tukey (P>0,05).

3.1.2.3. Leucograma

O número total de leucócitos, linfócitos, neutrófilos, monócitos, células granulocíticas especiais (CGEs) e eosinófilos dos juvenis de pacu mantidos sob elevada densidade de estocagem (50 kg/m³) e alimentados com dietas contendo 0, 10, 20 ou 30% de colostro bovino está representado na Tabela 6. Não houve diferença significativa (P>0,05) entre os tratamentos (P>0,05).

Tabela 6. Número total de leucócitos, linfócitos, monócitos, neutrófilos, células granulocíticas especiais (CGEs) e eosinófilos por microlitro dos juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com dietas contendo 0, 10, 20 ou 30% de colostro bovino liofilizado e adensados a 50 kg/m³ (média $\pm$ desvio padrão).

Variável Analisada	Dieta ¹				P
	0% CBL	10% CBL	20% CBL	30% CBL	
Leucócitos/μL ($\times 10^3$)	2,5 $\pm$ 0,9	3,4 $\pm$ 0,1	2,6 $\pm$ 0,1	4,0 $\pm$ 0,3	N.S.
Linfócitos/μL	496 $\pm$ 246	602 $\pm$ 176	991 $\pm$ 656	850 $\pm$ 218	N.S.
Monócitos/μL	621 $\pm$ 313	598 $\pm$ 293	864 $\pm$ 280	1.154 $\pm$ 617	N.S.
Neutrófilos/μL	1.858 $\pm$ 1.181	1.515 $\pm$ 895	1.298 $\pm$ 460	1.538 $\pm$ 1.364	N.S.
CGE/μL	304 $\pm$ 115	184 $\pm$ 97	338 $\pm$ 246	209 $\pm$ 117	N.S.
Eosinófilos/μL	9 $\pm$ 11	2 $\pm$ 8	2 $\pm$ 4	5 $\pm$ 10	N.S.

OBS.: ¹0% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 0% de inclusão de colostro bovino liofilizado (CBL); 10% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 10% de inclusão de CBL; 20% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 20% de inclusão de CBL; 30% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 30% de inclusão de CBL; números seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente ($P>0,05$); N.S.= não significativo para o teste de Tukey ($P>0,05$).

3.1.2.4. Trombograma

O número total de trombócitos dos juvenis de pacu mantidos sob elevada densidade de estocagem e alimentados com dietas contendo 0, 10, 20 ou 30% de colostro bovino está representado na Tabela 7. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos para o teste de Tukey ($P>0,05$).

Tabela 7. Número total de trombócitos dos juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com dietas contendo 0, 10, 20 ou 30% de colostro bovino liofilizado e adensados a 50 kg/m³ (média ± desvio padrão).

Variável Analisada	Dieta ¹				P
	0% CBL	10% CBL	20% CBL	30% CBL	
Trombócitos/μL (x10³)	27,6±6,2	43,0±10,5	31,0±7,3	28,6±14,2	N.S.

OBS: ¹0% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 0% de inclusão de colostro bovino liofilizado (CBL); 10% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 10% de inclusão de CBL; 20% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 20% de inclusão de CBL; 30% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 30% de inclusão de CB; N.S.= não significativo para o teste de Tukey (P>0,05).

3.1.2.5. Imunoglobulinas séricas

O valor ZST correspondente à quantidade de imunoglobulinas séricas dos juvenis de pacu mantidos sob elevada densidade de estocagem e alimentados com dietas contendo 0, 10, 20 ou 30% de colostro bovino está representado na Tabela 8. Não houve diferença significativa (P>0,05) entre os tratamentos (P>0,05).

Tabela 8. Valor ZST correspondente à quantidade de imunoglobulinas séricas dos juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com dietas contendo 0, 10, 20 ou 30% de colostro bovino liofilizado e adensados a 50 kg/m³ (média ± desvio padrão).

Variável Analisada	Dieta ¹				P
	0% CBL	10% CBL	20% CBL	30% CBL	
Valor ZST	14,3±2,3	16,2±2,3	13,5±4,9	13,5±1,5	N.S.

OBS: ¹0% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 0% de inclusão de colostro bovino liofilizado (CBL); 10% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 10% de inclusão de CBL; 20% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 20% de inclusão de CBL; 30% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 30% de inclusão de CBL; N.S.= não significativo (P>0,05).

3.2. Experimento de Estresse Agudo - Baixa Oxigenação

3.2.1. Parâmetros Zootécnicos

Os parâmetros de desempenho para os peixes alimentados com dietas contendo 0, 10, 20 ou 30% de colostro bovino liofilizado estão apresentados na Tabela 9. Houve diferença significativa entre os tratamentos quanto ao parâmetro consumo alimentar ($P < 0,05$), sendo que o grupo que recebeu dieta contendo 10% de colostro bovino liofilizado (CBL) apresentou menor consumo em relação ao grupo que recebeu 20% de CBL na dieta. Para os demais parâmetros analisados, não houve diferença significativa ($P > 0,05$).

Tabela 9. Parâmetros de desempenho de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com dietas contendo 0, 10, 20 ou 30% de colostro bovino liofilizado e mantidos sob baixa oxigenação (0,75 mg/L) (média $\pm$ desvio padrão).

Desempenho	Dieta ¹				P
	0% CBL	10% CBL	20% CBL	30% CBL	
Biomassa inicial (g)	698 $\pm$ 42	718 $\pm$ 44	787 $\pm$ 80	773 $\pm$ 36	N.S.
Biomassa final (g)	748 $\pm$ 51	774 $\pm$ 49	854 $\pm$ 87	848 $\pm$ 19	N.S.
Ganho de peso (g)	50 $\pm$ 13	56 $\pm$ 22	64 $\pm$ 16	75 $\pm$ 28	N.S.
Ganho de peso relativo (%)	7,1 $\pm$ 1,6	7,8 $\pm$ 3,1	8,2 $\pm$ 1,8	9,9 $\pm$ 3,9	N.S.
Consumo total (g)	96 $\pm$ 34ab	85 $\pm$ 42b	123 $\pm$ 13a	105 $\pm$ 35ab	*
Conversão alimentar (CA)	2,1 $\pm$ 1,2	1,7 $\pm$ 0,8	2,0 $\pm$ 0,5	1,7 $\pm$ 1,1	N.S.
Taxa de crescimento específico (TCE) (%)	0,26 $\pm$ 0,06	0,28 $\pm$ 0,1	0,29 $\pm$ 0,06	0,35 $\pm$ 0,13	N.S.
Sobrevivência (S) (%)	100	100	100	100	

OBS.: ¹0% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 0% de inclusão de colostro bovino liofilizado (CBL); 10% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 10% de inclusão de CBL; 20% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 20% de inclusão de CBL; 30% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 30% de inclusão de CBL; médias seguidas de letras diferentes são estatisticamente diferentes ($P < 0,05$); * = $P < 0,05$; N.S. = $P > 0,05$.

3.2.2. Parâmetros Hematológicos

3.2.2.1. Eritrograma, hematócrito e estimativa da hemoglobina

O número total de eritrócitos, o percentual de hematócrito e a taxa de hemoglobina (g/dL) observados para os juvenis de pacu mantidos sob condição de baixa oxigenação (0,75 mg/L) e alimentados com dietas contendo 0, 10, 20 ou 30% de inclusão de colostro bovino liofilizado está representado na Tabela 10. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ($P>0,05$).

Tabela 10. Número total de eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$), percentual de hematócrito (%) e taxa de hemoglobina dos juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com dietas contendo 0, 10, 20 ou 30% de colostro bovino liofilizado e mantidos sob baixa oxigenação (0,75mg/L) (média $\pm$ desvio padrão).

Variável Analisada	Dieta ¹				P
	0% CBL	10% CBL	20% CBL	30% CBL	
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	1,4 $\pm$ 0,4	1,5 $\pm$ 0,6	1,1 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,2	N.S.
Hematócrito (%)	27,2 $\pm$ 9,0	27,2 $\pm$ 11,2	25,3 $\pm$ 8,0	31,6 $\pm$ 1,7	N.S.
Hemoglobina (g/dL)	6,6 $\pm$ 0,9	7,6 $\pm$ 1,1	6,2 $\pm$ 1,6	7,4 $\pm$ 1,1	N.S.

OBS.: ¹0% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 0% de inclusão de colostro bovino liofilizado (CBL); 10% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 10% de inclusão de CBL; 20% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 20% de inclusão de CBL; 30% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 30% de inclusão de CBL; N.S.= não significativo ($P>0,05$).

3.2.2.2. Índices hematimétricos

Os valores dos índices hematimétricos observados para os juvenis de pacu mantidos sob condição de baixa oxigenação (0,75 mg/L) e alimentados com dietas contendo 0, 10, 20 ou 30% de colostro bovino estão representados na Tabela 11. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos ($P>0,05$).

Tabela 11. Índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) dos juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com dietas contendo 0, 10, 20 ou 30% de colostro bovino liofilizado e mantidos sob baixa oxigenação (0,75 mg/L) (média $\pm$ desvio padrão).

Variável Analisada	Dieta ¹				P
	0% CBL	10% CBL	20% CBL	30% CBL	
VCM (fL)	191,5 $\pm$ 25,4	179,1 $\pm$ 31,2	262,0 $\pm$ 99,3	201,9 $\pm$ 24,0	N.S.
HCM (pg/cel)	49,5 $\pm$ 11,5	62,7 $\pm$ 37,8	69,5 $\pm$ 38,3	46,9 $\pm$ 3,6	N.S.
CHCM (g/dL)	26,9 $\pm$ 9,6	38,4 $\pm$ 26,6	29,6 $\pm$ 14,4	23,4 $\pm$ 3,4	N.S.

OBS.: 0% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 0% de inclusão de colostro bovino liofilizado (CBL); 10% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 10% de inclusão de CBL; 20% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 20% de inclusão de CBL; 30% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 30% de inclusão de CBL; N.S.= não significativo ($P>0,05$).

3.2.2.3. Leucograma

O número total de leucócitos, linfócitos, neutrófilos, monócitos, células granulocíticas especiais (CGEs) e eosinófilos dos juvenis de pacu mantidos sob condição de baixa oxigenação (0,75 mg/L) e alimentados com dietas contendo 0, 10, 20 ou 30% de colostro bovino estão representados na Tabela 12. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos ($P>0,05$).

Tabela 12. Número total de leucócitos (μL ($\times 10^3$)), linfócitos, monócitos, neutrófilos, células granulocíticas especiais (CGEs) e eosinófilos dos juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com dietas contendo 0, 10, 20 ou 30% de colostro bovino liofilizado e mantidos sob baixa oxigenação (0,75 mg/L) (média $\pm$ desvio padrão).

Variável Analisada	Dieta ¹				P
	0% CBL	10% CBL	20% CBL	30% CBL	
Leucócitos/μL ($\times 10^3$)	2,8 $\pm$ 0,8 ab	3,2 $\pm$ 1,5 ab	1,9 $\pm$ 1,0 b	3,7 $\pm$ 1,3 a	*
Linfócitos/μL	462 $\pm$ 406 a	742 $\pm$ 471 a	400 $\pm$ 314 a	576 $\pm$ 521 a	N.S.
Monócitos/μL	433 $\pm$ 108 ab	451 $\pm$ 188 ab	308 $\pm$ 229 b	809 $\pm$ 425 a	*
Neutrófilos/μL	1.484 $\pm$ 1.100 a	1.396 $\pm$ 840 a	902 $\pm$ 578 a	1.931 $\pm$ 860 a	N.S.
CGE/μL	365 $\pm$ 107 ab	595 $\pm$ 367 a	271 $\pm$ 110 b	391 $\pm$ 141 ab	*
Eosinófilos/μL	13 $\pm$ 10 a	10 $\pm$ 6 a	8 $\pm$ 5 a	12 $\pm$ 16 a	N.S.

OBS.: ¹0% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 0% de inclusão de colostro bovino liofilizado (CBL); 10% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 10% de inclusão de CBL; 20% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 20% de inclusão de CBL; 30% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 30% de inclusão de CBL; médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente ($P < 0,05$); * = significativo ($P < 0,05$); N.S. = não significativo ($P > 0,05$);

3.2.2.4. Trombograma

O número total de trombócitos dos juvenis de pacu mantidos sob condição de baixa oxigenação (0,75mg/L) e alimentados com dietas contendo 0, 10, 20 ou 30% de colostro bovino está representado na Tabela 13. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos para o teste de Tukey ($P > 0,05$).

Tabela 13. Número total de trombócitos (μL ($\times 10^3$) dos juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com dietas contendo 0, 10, 20 ou 30% de colostro bovino liofilizado e mantidos sob baixa oxigenação (0,75 mg/L) (média $\pm$ desvio padrão).

Variável Analisada	Dieta ¹				P
	0% CBL	10% CBL	20% CBL	30% CBL	
Trombócitos/μL ($\times 10^3$)	23,6 $\pm$ 7,3	22,8 $\pm$ 13,4	20,3 $\pm$ 14,9	20,1 $\pm$ 0,6	N.S.

OBS.: ¹0% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 0% de inclusão de colostro bovino liofilizado (CBL); 10% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 10% de inclusão de CBL; 20% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 20% de inclusão de CBL; 30% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 30% de inclusão de CBL; N.S.= não significativo ($P>0,05$).

3.2.2.5. Imunoglobulinas séricas

O valor ZST correspondente à quantidade de imunoglobulinas séricas dos juvenis de pacu mantidos sob condição de baixa oxigenação (0,75mg/L) e alimentados com dietas contendo 0, 10, 20 ou 30% de colostro bovino está representado na Tabela 14. Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P>0,05$).

Tabela 14. Valor ZST correspondente à quantidade de imunoglobulinas séricas dos juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentados com dietas contendo 0, 10, 20 ou 30% de colostro bovino liofilizado e mantidos sob baixa oxigenação (0,75mg/L) (média $\pm$ desvio padrão).

Variável Analisada	Dieta ¹				P
	0% CBL	10% CBL	20% CBL	30% CBL	
Valor ZST	11,1 $\pm$ 1,3	11,1 $\pm$ 1,4	12,9 $\pm$ 2,4	10,6 $\pm$ 4,1	N.S.

OBS.: ¹0% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 0% de inclusão de colostro bovino liofilizado (CBL); 10% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 10% de inclusão de CBL; 20% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 20% de inclusão de CBL; 30% CBL = juvenis alimentados com dieta contendo 30% de inclusão de CBL; N.S.= não significativo ($P>0,05$).

4. DISCUSSÃO

O status nutricional dos peixes, além dos fatores genéticos e ambientais, pode ser considerado o aspecto que mais influencia a resposta imune, modulando a resistência à infecção. Os imunoestimulantes dietéticos podem ajudar na defesa contra infecções, no entanto, há muito a se conhecer sobre o período de tratamento, dose ideal e via de administração em várias espécies de peixes (Mulero et al., 1998; Sink e Lochmann, 2014). Alguns componentes encontrados no colostro bovino podem atuar como imunoestimulantes, uma vez que trabalhos demonstram a ação em nível sérico de componentes encontrados no colostro bovino atuando na diminuição dos efeitos negativos do estresse (Sakai et al., 1993; Kakuta et al., 1998). A administração oral de lactoferrina bovina para carpas e truta arco-íris mantidas em condições ambientais estressantes, tais como hipóxia e infecção bacteriana, levou à diminuição dos níveis de glicose, cortisol, catecolaminas e do hematócrito além de maior atividade fagocítica em relação aos animais que não receberam o composto na dieta, resultando em significativa diminuição dos efeitos negativos do estresse a esses animais (Kakuta et al., 1998; Sakai et al., 1993). Além disso, os fatores antioxidantes presentes no colostro bovino podem atuar na diminuição dos efeitos oxidativos causados pelo estresse. As vitaminas C e E são um desses fatores encontrados no colostro que são muito estudados quanto à sua eficácia na melhora do sistema imune. Quando administradas em altas doses a diferentes espécies de peixes, resultaram em significativa melhora na imunidade, através do aumento da atividade fagocítica, do sistema complemento, de macrófagos e melhorando o burst oxidativo das células de defesa (Anbarasu e Chandran, 2001; Gabaudan e Verlhac, 2001; Ortuño et al., 2001; Ortuño et al., 2003; Ai et al., 2004; Chen et al., 2004; Lin e Shiau, 2004; Belo et al., 2005; Lin e Shiau, 2005; Ai et al., 2006; Azad et al., 2007; Misra et al., 2007).

No presente estudo, não foi observada ação da presença de colostro sobre os elementos séricos avaliados para os juvenis de pacu que receberam o composto na dieta. Por outro lado, trabalhos demonstram a ação tópica dos componentes do colostro bovino no trato gastrintestinal de algumas espécies como caprinos, ovinos e também em peixes (Rodrigues et al., 2010; Moretti et al., 2010b; Moretti et al., 2012b; Machado-Neto et al., 2013; Nordi et al., 2013; Moretti et al., 2014a; Moretti et al., 2014b). Nesta perspectiva, sugere-se que os elementos do colostro bovino podem não chegar intactos na corrente sanguínea destes animais, inviabilizando seus efeitos séricos, ou a concentração de moléculas bioativas não foi disponibilizada em concentração suficiente. Sado et al. (2013), trabalhando com diferentes

níveis de suplementação de vitamina E na dieta de pacus (25, 50, 150, 300 e 600 mg/kg de dieta), um dos compostos antioxidantes presentes no colostro bovino, não observaram diferenças no número total de células de defesa e na contagem diferencial de leucócitos, assim como no presente trabalho. Kiron et al. (2004), trabalhando com inclusão de 1000 mg/kg desta vitamina na dieta de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) também não observaram diferenças nas variáveis séricas analisadas, quando comparados com os animais que não receberam o composto. A vitamina E quando administrada na dieta de peixes mantidos em situações de estresse agudo ou crônico, somente obteve efeito significativo nos animais que estavam mantidos sob estresse agudo, que apresentaram um discreto aumento na imunomodulação (Montero et al., 2001). Sendo assim, sugere-se que os níveis desta vitamina antioxidante, assim como dos demais compostos antioxidantes presentes nas dietas contendo colostro fornecidas no presente trabalho, podem não ter sido suficientes para causar efeito na imunomodulação.

Se por um lado não houve efeito positivo do papel antioxidante do colostro bovino nos elementos séricos avaliados dos juvenis de pacu, deve-se destacar que não houve efeito negativo à esta fonte de proteína heteróloga fornecida aos peixes, uma vez que não houve diferenças no desempenho dos animais que receberam o composto na dieta. Este fato viabiliza a administração desta substância inovadora aos peixes, que é excedente em regiões produtoras de leite. Num sistema intensivo de aquicultura, assim como para a maioria dos sistemas de produção animal, a alimentação representa mais de 50% do custo operacional, sendo a proteína o elemento mais caro (El-Sayed, 1999). A farinha de peixe é a fonte proteica tradicionalmente utilizada na formulação de dietas para peixes que, além de ser onerosa (Tacon, 1993; El-Sayed, 1999), possui o problema de causar danos ambientais e alto potencial de lixiviação, causando grandes perdas para a produção (Tsukamoto e Takahashi, 1992). Assim, a busca de alternativas que possam diminuir o seu uso na formulação de rações se constitui de grande importância para a piscicultura.

O desenvolvimento de medidas eficazes para conferir um melhor estado de saúde para os peixes, como o desenvolvimento de dietas que possam atuar na imunidade, requer uma melhor compreensão do sistema de proteção destes animais (Solem and Stenvik, 2006; Vesely et al., 2006). Para avaliar a imunidade humoral em peixes, as concentrações de IgM no plasma têm sido determinadas através de técnicas de aglutinação, precipitação ou pelo teste de ELISA (Misra et al., 2006). No presente trabalho, as imunoglobulinas foram estimadas através do método e Turvação por Sulfato de Zinco (ZST), técnica que avalia a concentração das imunoglobulinas através da leitura espectrofotométrica da turvação resultante da reação das

imunoglobulinas, macromoléculas que possuem alto peso molecular, com o sulfato de zinco. Os valores obtidos no presente trabalho condizem com os valores considerados normais para imunoglobulinas séricas em peixes (0,6-16 mg/mL) (Solem e Stenvik, 2006), comprovando a viabilidade e acurácia do método testado. A técnica possui a particularidade de detectar uma gama maior de macromoléculas do que o ELISA, técnica mais utilizada atualmente para dosagem de imunoglobulinas de peixe, permitindo a dosagem das diversas isoformas que podem ser encontradas nos peixes e também das diferentes imunoglobulinas, como IgT e IgZ. Considerando a relativa simplicidade e baixo custo deste procedimento, esta avaliação inicial do método ZST para peixes é plenamente justificável, pois possui condições de ser utilizado por produtores para estimar a condição de resistência dos peixes, consistindo-se em uma importante ferramenta para a piscicultura.

REFERÊNCIAS

- Ai, Q. H., Mai, K. S., Tan, B. P., Xu, W., Zhang, W. B., Ma, H. M. & Liufu, Z. G. (2006). Effects of dietary vitamin C on survival, growth, and immunity of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Aquaculture* **261**, 327-336.
- Ai, Q. H., Mai, K. S., Zhang, C. X., Xu, W., Duan, Q. Y., Tan, B. P. & Liufu, Z. G. (2004). Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture* **242**, 489-500.
- Alcorn, S. W., Pascho, R. J., Murray, A. L. & Shearer, K. D. (2003). Effects of ration level on immune functions in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture* **217**, 529-545.
- Anbarasu, K. & Chandran, M. R. (2001). Effect of ascorbic acid on the immune response of the catfish, *Mystus gulio* (Hamilton), to different bacterins of *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* **11**, 347-355.
- Azad, I. S., Dayal, J. S., Poornima, M. & Ali, S. A. (2007). Supra dietary levels of vitamins C and E enhance antibody production and immune memory in juvenile milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal) to formalin-killed *Vibrio vulnificus*. *Fish & Shellfish Immunology* **23**, 154-163.
- Beerli, E. L., Logato, P. V. R. & de Freitas, R. T. F. (2004). Alimentação e comportamento de larvas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Cienc. Agrotecnology, Lavras* **28**, 149-155.
- Belo, M. A. A., Schalch, S. H. C., Moraes, F. R., Soares, V. E., Otoboni, A. & Moraes, J. E. R. (2005). Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. *Journal of Comparative Pathology* **133**, 146-154.
- Blazer, V. S. (1991). Piscine macrophage function and nutritional influences: a review. *Journal of Aquatic Animal Health* **3**, 77-86.
- Bodammer, P., Maletzki, C., Waitz, G. & Emmrich, J. (2011). Prophylactic application of bovine colostrum ameliorates murine colitis via induction of immunoregulatory cells. *The Journal of nutrition* **141**, 1056-1061.
- Bonga, S. W. (1997). The stress response in fish. *Physiological reviews* **77**, 591-625.

- Boudry, C. & Thewis, A. (2009). Bovine colostrum as a natural growth factor for newly-weaned piglets: a review. *Bulletin of UASVM Animal Science and Biotechnologies* **66**, 1-2.
- Brambell, F. W. R. (1958). The passive immunity of the young mammal. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **33**, 488-531.
- Bricknell, I. & Dalmo, R. A. (2005). The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish & shellfish immunology* **19**, 457-472.
- Campbell, S., Siegel, M. & Knowlton, B. J. (1977). Sheep immunoglobulins and their transmission to the neonatal lamb. *New Zealand Veterinary Journal* **25**, 361-365.
- Chen, R., Lochmann, R., Goodwin, A., Praveen, K., Dabrowski, K. & Lee, K.-J. (2004). Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). *Aquaculture* **242**, 553-569.
- Chrousos, G. P. & Gold, P. W. (1992). The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis. *Jama* **267**, 1244-1252.
- Colt, J. (1991). Aquacultural production systems. *Journal of Animal Science* **69**, 4183-4192.
- Corbel, M. (1975). The immune response in fish: a review. *Journal of Fish Biology* **7**, 539-563.
- Crescencio, R. & Baldisserotto, B. (2005). Ictiofauna brasileira e seu potencial para criação. *Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria: Editora UFMS*, 23-36.
- Danilova, N., Bussmann, J., Jekosch, K. & Steiner, L. A. (2005). The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z. *Nature immunology* **6**, 295-302.
- Davis, K. B., Griffin, B. R. & Gray, W. L. (2002). Effect of handling stress on susceptibility of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, to *Ichthyophthirius multifiliis* and channel catfish virus infection. *Aquaculture* **214**, 55-66.
- Demers, N. E. & Bayne, C. J. (1997). The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Developmental and Comparative Immunology* **21**, 363-373.
- Edholm, E.-S., Bengtén, E., Stafford, J. L., Sahoo, M., Taylor, E. B., Miller, N. W. & Wilson, M. (2010). Identification of two IgD⁺ B cell populations in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *The Journal of Immunology* **185**, 4082-4094.

- El-Sayed, A.-F. M. (1999). Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. *Aquaculture* **179**, 149-168.
- Ellis, A. E. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology* **25**, 827-839.
- Endo, Y., Takahashi, M., Nakao, M., Saiga, H., Sekine, H., Matsushita, M., Nonaka, M. & Fujita, T. (1998). Two lineages of mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP) in vertebrates. *Journal of Immunology* **161**, 4924-4930.
- FAO (2017). FAO Global CaptureProduction database updated to 2015 - Summary information.
- Fast, M. D., Sims, D. E., Burka, J. F., Mustafa, A. & Ross, N. W. (2002). Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology* **132**, 645-657.
- Fletcher, G. (1975). The effects of capture, " stress," and storage of whole blood on the red blood cells, plasma proteins, glucose, and electrolytes of the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Canadian Journal of Zoology* **53**, 197-206.
- Fujimoto, R. Y., Castro, M. P. d., Honorato, C. A. & Moraes, F. R. d. (2007). Composição corporal e eficiência de utilização de nutrientes por pacus alimentados com ração suplementada com cromo trivalente. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 1763-1768.
- Gabaudan, J., Verlhac, V. & Dabrowski, K. (2000). Critical review of the requirements of ascorbic acid in cold and cool water fishes (salmonid, percids, plecoglossids and flatfishes). *Ascorbic Acid in aquatic organisms: Status and perspectives*, 33.
- Garcia, F., Pilarski, F., Onaka, E. M., de Moraes, F. R. & Martins, M. L. (2007). Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture* **271**, 39-46.
- Ha, N., Gonçalves, A. F. N., Sousa, L. C., Biller-Takahashi, J. D. & Takahashi, L. S. (2016). Dietary carbohydrates and protein of yeast modulate the early stages of innate immune response in tilapia (*Oreochromis niloticus*) primarily after LPS inoculation. *Aquaculture International*, 1-22.

- Hamre, K., Waagbø, R., Berge, R. K. & Lie, Ø. (1997). Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). *Free Radical Biology and Medicine* **22**, 137-149.
- Hansen, J. D., Landis, E. D. & Phillips, R. B. (2005). Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 6919-6924.
- Hardy, R. W. (2001). Nutritional deficiencies in commercial aquaculture: likelihood, onset, and identification. *Nutrition and Fish Health*, 131-147.
- Harris, J. & Bird, D. J. (2000). Modulation of the fish immune system by hormones. *Veterinary immunology and immunopathology* **77**, 163-176.
- Holland, M. C. H. & Lambris, J. D. (2002). The complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology* **12**, 399-420.
- Houston, A., Roberts, W. & Kennington, J. (1996). Hematological response in fish: pronephric and splenic involvements in the goldfish, *Carassius auratus* L. *Fish Physiology and Biochemistry* **15**, 481-489.
- Huguet, A., Sève, B., Le Dividich, J. & Le Huërou-Luron, I. (2006). Effects of a bovine colostrum-supplemented diet on some gut parameters in weaned piglets. *Reproduction Nutrition Development* **46**, 167-178.
- Iwama, G. K. (1998). Stress in fish. *Annals of the New York Academy of Sciences* **851**, 304-310.
- Jaramillo Jr, F., Peng, L. & Gatlin Iii, D. (2009). Selenium nutrition of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) bioavailability, toxicity and interaction with vitamin E. *Aquaculture nutrition* **15**, 160-165.
- Jeffcott, L. (1972a). Passive immunity and its transfer with special reference to the horse. *Biological Reviews* **47**, 439-464.
- Jomori, R. K., Carneiro, D. J., Malheiros, E. B. & Portella, M. C. (2003). Growth and survival of pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. *Aquaculture* **221**, 277-287.
- Kaattari, S., Evans, D., Klemer, J. & Kierae, J. (1998). Varied redox forms of teleost IgM: an alternative to isotypic diversity? *Immunological reviews* **166**, 133-142.

- Kaattari, S. L. (1992). Fish B lymphocytes: defining their form and function. *Annual Review of Fish Diseases* **2**, 161-180.
- Kakuta, I. (1998). Reduction of stress response in carp, *Cyprinus carpio* L., held under deteriorating environmental conditions, by oral administration of bovine lactoferrin. *Journal of fish diseases* **21**, 161-167.
- Laing, K. J. & Hansen, J. D. (2011). Fish T cells: Recent advances through genomics. *Developmental and Comparative Immunology* **35**, 1282-1295.
- Landolt, M. L. (1989). The relationship between diet and the immune response of fish. *Aquaculture* **79**, 193-206.
- Lim, C., Shoemaker, C. A. & Klesius, P. H. (2001). The effect of ascorbic acid on the immune response of fish. *Ascorbic Acid in Aquatic Organisms. Status and Perspectives*, 149-166.
- Lima, A. L., Pauletti, P., Susin, I. & Machado-Neto, R. (2009). Fluctuation of serum variables in goats and comparative study of antibody absorption in new-born kids using cattle and goat colostrum. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science* **38**, 2211-2217.
- Lin, M. F. & Shiau, S. Y. (2004). Requirements of vitamin C (L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg and L-ascorbyl-2-monophosphate-Na) and its effects on immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture nutrition* **10**, 327-333.
- Machado Neto, O. R., Ladeira, M. M., Gonçalves, T. d. M., Lopes, L. S., Oliveira, D. M. d. & Bassi, M. S. (2010). Feed intake and prediction assessments using the NRC, CNCPS and BR-CORTE systems in Nellore and Red Norte steers finished in feedlot. *Revista Brasileira de Zootecnia* **39**, 394-401.
- Machado Neto, R., Packer, I. & Susin, I. (1989). Concentration of serum immunoglobulin, body weight and diarrhea, on Holstein calves with different feeding diets. *Turrialba (Costa Rica) Ene-Mar* **39**, 51-55.
- Machado-Neto, R., Pontin, M. C. F., Nordi, W. M., Lima, A. L. & Moretti, D. B. (2013). Goblet cell mucin distribution in the small intestine of newborn goat kids fed lyophilized bovine colostrum. *Livestock Science* **157**, 125-131.
- Magnadottir, B., Lange, S., Gudmundsdottir, S., Bogwald, J. & Dalmo, R. A. (2005). Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish & Shellfish Immunology* **19**, 429-439.

- Martins, M., Pilarsky, F., Onaka, E., Nomura, D., Fenerick, J., Ribeiro, K., Myiazaki, D., Castro, M. & Malheiros, E. (2004). Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. *Boletim do Instituto de Pesca* **30**, 71-80.
- Matushima, E. & Mariano, M. (1996). Kinetics of the inflammatory reaction induced by carrageenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). *Brazilian Journal of veterinary Research and animal Science* **33**, 5-10.
- McEwan, A., Fisher, E., Selman, I. & Penhale, W. (1970). A turbidity test for the estimation of immune globulin levels in neonatal calf serum. *Clinica Chimica Acta* **27**, 155-163.
- Merola, N. & De Souza, J. H. (1988). Preliminary studies on the culture of the pacu, *Colossoma mitrei*, in floating cages: effect of stocking density and feeding rate on growth performance. *Aquaculture* **68**, 243-248.
- Miller, N., Wilson, M., Bengten, E., Stuge, T., Warr, G. & Clem, W. (1998). Functional and molecular characterization of teleost leukocytes. *Immunological Reviews* **166**, 187-197.
- Misra, C. K., Das, B. K., Mukherjee, S. C. & Pradhan, J. (2007). Effects of dietary vitamin C on immunity, growth and survival of Indian major carp, *Labeo rohita*, fingerlings. *Aquaculture Nutrition* **13**, 35-44.
- Montero, D., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J. & Izquierdo, M. (2001). Low vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Fish & Shellfish Immunology* **11**, 473-490.
- Moretti, D. B., Nordi, W. M., Cruz, T. M. P., Cyrino, J. E. P. & Machado-Neto, R. (2014a). Histochemical distribution of intestinal enzymes of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fed lyophilized bovine colostrum. *Fish Physiology and Biochemistry* **40**, 1487-1493.
- Moretti, D. B., Nordi, W. M., Lima, A. L., Pauletti, P. & Machado-Neto, R. (2014b). Enteric, hepatic and muscle tissue development of goat kids fed with lyophilized bovine colostrum. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **98**, 201-208.
- Moretti, D. B., Nordi, W. M., Lima, A. L., Pauletti, P., Susin, I. & Machado-Neto, R. (2012b). Goat kids' intestinal absorptive mucosa in period of passive immunity acquisition. *Livestock Science* **144**, 1-10.

- Moretti, D. B., Pauletti, P., Kindlein, L. & Machado-Neto, R. (2010b). Enteric cell proliferation in newborn lambs fed bovine and ovine colostrum. *Livestock Science* **127**, 262-266.
- Morgan, B. P., Marchbank, K. J., Longhi, M. P., Harris, C. L. & Gallimore, A. M. (2005). Complement: central to innate immunity and bridging to adaptive responses. *Immunology Letters* **97**, 171-179.
- Mulero, V., Esteban, M. A., Munoz, J. & Meseguer, J. (1998). Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* **8**, 49-62.
- Nayak, S. (2010). Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish & shellfish immunology* **29**, 2-14.
- Nikoskelainen, S., Salminen, S., Bylund, G. & Ouwehand, A. C. (2001). Characterization of the properties of human-and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 2430-2435.
- Nonaka, M. & Smith, S. L. (2000). Complement system of bony and cartilaginous fish. *Fish & Shellfish Immunology* **10**, 215-228.
- Nordi, W. M., Moretti, D. B., Lima, A. L., Pauletti, P., Susin, I. & Machado-Neto, R. (2013). Intestinal histology of newborn goat kids fed lyophilized bovine colostrum. *Czech Journal of Animal Science* **58**, 232-241.
- Oliveira, A., Conte, L. & Cyrino, J. (2004). Produção de Characiformes autóctones. *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo: TecArt, 217-238.
- Ortuno, J., Cuesta, A., Esteban, M. A. & Meseguer, J. (2001). Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **79**, 167-180.
- Ortuno, J., Esteban, M. A. & Meseguer, J. (2003). The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* **14**, 145-156.
- Ostrensky, A. & Boeger, W. (2008). Principais problemas enfrentados atualmente pela aquicultura brasileira. *OSTRENSKY, Antonio; BORGHETTI, José Roberto, SOTO, Dóris. Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer*, 135-158.

- Ozório, R., Avnimelech, Y., Castagnolli, N., CYRINO, J., URBINATI, E., FRACALOSSI, D. & CASTAGNOLLI, N. (2004). Sistemas intensivos fechados de produção de peixes. *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo: TecArt, 7-24.
- Pandey, N., Dar, A., Mondal, D. & Nagaraja, L. (2011). Bovine colostrum: a veterinary nutraceutical. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health* **3**, 31-35.
- Pavanelli, G., Eiras, J., Takemoto, R., Ranzani-Paiva, M. & Magalhaes, A. (2000). Sanidade de peixes, rãs, crustáceos e moluscos. *Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável*. CNPq, Brasília, 197-246.
- Pezzato, L., Barros, M., Fracalossi, D., Cyrino, J., Urbinati, E. & Fracalossi, D. (2004). Nutrição de peixes. *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo: TecArt, 75-169.
- Raa, J. (2000). The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. *Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola* **19**, 47-56.
- Ranzani-Paiva, M. J. T. & Silva-Souza, A. (2004). Hematologia de peixes brasileiros. *Sanidade de organismos aquáticos*. São Paulo: Varela, 89-120.
- Ranzani-Paiva, M. J. T., de Pádua, S. B., Tavares-Dias, M. & Egami, M. I. (2013). *Métodos para análise hematológica em peixes*: Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM.
- Robertsen, B. (1999). Modulation of the non-specific defence of fish by structurally conserved microbial polymers. *Fish & Shellfish Immunology* **9**, 269-290.
- Rodrigues, A. P. O., Pauletti, P., Kindlein, L., Delgado, E. F., Cyrino, J. E. P. & Machado-Neto, R. (2010). Intestinal histomorphology in *Pseudoplatystoma fasciatum* fed bovine colostrum as source of protein and bioactive peptides. *Scientia Agricola* **67**, 524-530.
- Rosenfeld, G. (1947). Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. *Mem. Inst. Butantan* **20**, 315-328.
- Sado, R. Y., Bicudo, A. J. A. & Cyrino, J. E. P. (2013). Growth and hematology of juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) fed with increasing levels of vitamin E (DL-alpha-tocopheryl acetate). *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias* **85**, 385-393.
- Sakai, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* **172**, 63-92.

- Sakai, M., Otubo, T., Atsuta, S. & Kobayashi, M. (1993). Enhancement of resistance to bacterial infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by oral administration of bovine lactoferrin. *Journal of Fish Diseases* **16**, 239-247.
- Scapigliati, G., Romano, N. & Abelli, L. (1999). Monoclonal antibodies in fish immunology: identification, ontogeny and activity of T-and B-lymphocytes. *Aquaculture* **172**, 3-28.
- Schep, L. J., Tucker, I. G., Young, G., Ledger, R. & Butt, A. G. (1999). Controlled release opportunities for oral peptide delivery in aquaculture. *Journal of Controlled Release* **59**, 1-14.
- Secombes, C. (1997). 2 The Nonspecific Immune System: Cellular Defenses. *Fish Physiology* **15**, 63-103.
- Secombes, C. & Ellis, A. (2012). The immunology of teleosts. *Fish Pathology, Fourth Edition*, 144-166.
- Sink, T. D. & Lochmann, R. T. (2014). The effects of soybean lecithin supplementation to a practical diet formulation on juvenile Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*: growth, survival, hematology, innate immune activity, and lipid biochemistry. *Journal of the World Aquaculture Society* **45**, 163-172.
- Solem, S. T. & Stenvik, J. (2006). Antibody repertoire development in teleosts – a review with emphasis on salmonids and *Gadus morhua* L. *Developmental & Comparative Immunology* **30**, 57-76.
- Tacon, A. (1997). Contribution to food fish supplies. *FAO Fisheries Circular*, 17-21.
- Tacon, A. G. (1993). Feed ingredients for warmwater fish, fish meal and other processed feedstuffs.
- Tavares-Dias, M. (2006). Cytochemical method for staining fish basophils. *Journal of Fish Biology* **69**, 312-317.
- Tavares-Dias, M. & de Moraes, F. R. (2004). *Hematologia de peixes teleósteos*: Marcos Tavares-Dias.
- Tavares-Dias, M., Schalch, S. & Moraes, F. (2003). Hematological characteristics of Brazilian teleosts. VII. Parameters of seven species collected in Guariba, São Paulo State, Brazil. *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo* **29**, 109-115.

- Thompson, I., White, A., Fletcher, T., Houlihan, D. & Secombes, C. (1993). The effect of stress on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets containing different amounts of vitamin C. *Aquaculture* **114**, 1-18.
- Thorarinsson, R., Landolt, M. L., Elliott, D. G., Pascho, R. J. & Hardy, R. W. (1994). Effect of dietary vitamin E and selenium on growth, survival and the prevalence of *Renibacterium salmoninarum* infection in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture* **121**, 343-358.
- Tort, L., Balasch, J. & Mackenzie, S. (2003). Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología* **22**, 277-286.
- Tsukamoto, R. & Takahashi, N. (1992). Falta de proteína para ração: estrangulamento da aquicultura no Brasil. *Panorama da Aquicultura* **14**, 8-9.
- Urbinati, E. & Carneiro, P. C. F. (2004). Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva. Sociedade Brasileira de Aquicultura e biologia Aquática. Editora Tecart, São Paulo*, 171-193.
- Urbinati, E., Gonçalves, F. & Takahashi, L. (2005). Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil* **2**, 205-244.
- Val, A., Silva, M. & Val, V. (2004). Estresse em peixes—ajustes fisiológicos e distúrbios orgânicos. *Ranzani-Paiva MJT, Takemoto RM, Lizama MAP. Sanidade de organismos aquáticos. São Paulo: Varela*, 75-88.
- Valenti, W., Poli, C., Pereira, J. & Borghetti, J. (2000). Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável.
- Verschuere, L., Heang, H., Criel, G., Sorgeloos, P. & Verstraete, W. (2000). Selected Bacterial Strains Protect *Artemia* spp. from the Pathogenic Effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 1139-1146.
- Vesely, T., Reschova, S., Pokorova, D., Hulova, J. & Nevorankova, Z. (2006). Production of monoclonal antibodies against immunoglobulin heavy chain in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Veterinari Medicina-Praha* **51**, 296.
- Wintrobe, M. M. (1934). Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia haematol* **51**, 32-49.

- Zarkadis, I. K., Mastellos, D. & Lambris, J. D. (2001). Phylogenetic aspects of the complement system. *Developmental and Comparative Immunology* **25**, 745-762.
- Zelikoff, J. T. (1998). Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals? *Toxicology* **129**, 63-71.
- Zhang, Y.-A., Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, Z., LaPatra, S. E., Bartholomew, J. & Sunyer, J. O. (2010). IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature immunology* **11**, 827-835.

ANEXOS

ANEXO A. Fotomicrografias de extensões sanguíneas de juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) coradas pelo método de Rosenfeld modificado, segundo Tavares-Dias e Moraes (2003). Aumento de 10.000X.

ANEXO B. Manuscrito de artigo científico.

Hematological features of juvenile *Piaractus mesopotamicus* fed bovine colostrum and subjected to high stocking density and hypoxia

J. PAMPOLINI*, W.M. NORDI*, PONTIN, M.C.F., R. MACHADO-NETO* AND D.B. MORETTI*‡,

*Laboratório de Anatomia e Fisiologia Animal/Departamento de Zootecnia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brazil.

‡Author to whom correspondence should be addressed. Tel.: +55 19 34204260; email: dmoretti@usp.br

Running head: Hematological features of fish fed colostrum

Hematological characteristics were evaluated in juvenile pacu subjected to two adverse conditions, high stocking density and low oxygenation, and fed diets containing lyophilized bovine colostrum. This first milk secretion, a rich source of biologically active molecules can act positively in the animal protection system. In the high stocking density experimental design, juvenile pacu were allocated at high density (50 kg fish / m³) for 30 days. In the low oxygenation experimental design, the juveniles remained for 15 days in cages, being submitted to low concentration of oxygen (0.75 mg/L). During the experimental period, four diets containing 0, 10, 20 and 30% of lyophilized bovine colostrum (LBC) were given twice daily. At the end of experimental period, blood samples were collected from the caudal vein from eight or ten juveniles of each treatment from the high stocking density and low oxygenation experimental design, respectively. Performance parameters were recorded and was not influenced by the inclusion of LBC in the diet ($P > 0.05$). In the high stocking density experimental design, there was no statistical difference between the treatments ($P > 0.05$) for the hematological variables analyzed. In the low oxygenation experimental design, juveniles fed 30% LBC showed higher number of leukocytes and monocytes than ones fed 20% LBC and juveniles fed 10% LBC showed higher number of special granulocyte cells than ones fed 20% LBC ($P < 0.05$). Although bovine colostrum did influence the hematological variables analyzed, there was no negative effect on this source of heterologous protein supplied to the fish, since the performance of the fish that received the lacteal secretion was similar to animals that did not. Considering the present results, lyophilized bovine colostrum, a rich source of bioactive molecules, does not contribute to the protection of juvenile pacu subjected to high stocking density and low oxygenation.

Key words: milk secretion; teleost; omnivorous; growth performance; blood.

INTRODUCTION

Environmental variations and frequent management, in addition to population densification, are conditions that result in fish stress. This homeostatic unbalance affects the immune system and increases the susceptibility to diseases (Tort et al., 1996; Schep et al., 1999; Pavanelli et al., 2000; Davis, 2002). The hematological and immunological characteristics are important tools to evaluate physiological defenses, allowing the identification of fish responses to the challenge (Ranzani-Paiva et al., 2013) and the formulation of diets that can minimize the negative effects caused by stress.

There are two types of stress, acute and chronic, which can lead to different physiological responses. Acute stress generates responses that cause an extremely immunosuppressive condition, leading to large losses due to diseases. Chronic stress, in turn, which occurs when animals are kept for a long period in inappropriate situations, such as incorrect pH, low oxygenation and overpopulation, may lead to reduction or even inhibition of growth, reduced resistance to pathogens and reproductive failure (Bonga, 1997; Iwama, 1998). The responses to adverse conditions involve changes in blood composition, such as osmotic disorders, increased energetic substrate concentrations, increased activity of enzymes, changes in the number and activity of blood cells and decrease in humoral immune factors (Fletcher, 1975; Houston et al., 1996; Bonga, 1997).

The presence of defense elements can also be influenced by diet, changing the fish's ability to resist infectious diseases (Alcorn et al., 2013). Many substances have influence under the immune system and can be used as modulators of it (Harris, 2000). In recent years, the use of antibiotics has been criticized because of its negative impacts on the environment as well as fish. Thus, several substances have been used in fish culture as alternative treatments, additives or food supplements, such as probiotics, prebiotics, immunomodulators, immunonutrients and immunostimulants, with the objective of improving the performance and sanity of the animals (Verschuere et al., 2000; Nikoskelainen et al., 2001; Nayak, 2010).

Bovine colostrum has been used as an immunological and nutritional source for several species, mainly because of the high presence of protein, including immune, antioxidants and antimicrobial molecules, fats, carbohydrates, vitamins and minerals (Boudry & Thewis, 2009; Pandey et al., 2011). Thus, bovine colostrum, being a rich source of biological molecules can positively influence the resistance of fish against adverse condition and stimulate their immune capacity. The objective of this study was to evaluate the growth performance and

hematological features of juvenile *Piaractus mesopotamicus* fed diets containing lyophilized bovine colostrum and subjected to high stocking density and low oxygenation.

MATERIAL AND METHODS

EXPERIMENTAL DIETS

Bovine colostrum from Holsteins cows was collected, homogenized, frozen at -20°C and then lyophilized. The product obtained was stored at -20°C until inclusion in the diets. The bromatological composition of colostrum was determined according to AOAC (2000), Table I. Four isonitrogenated (32% crude protein) and isoenergetic (4000 kcal kg⁻¹) experimental diets were formulated considering 0, 10, 20 and 30% of lyophilized bovine colostrum (LBC) inclusion (Table II).

HIGH STOCKING DENSITY EXPERIMENTAL DESIGN

Juveniles pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) conditioned to receive artificial feeding were distributed into 16 cages (50 kg fish/m³) kept in a tank provided with continuous water flow and aeration in a closed circulation system and controlled conditions of temperature and luminosity (24±1°C and photoperiod of 12 hours). The water quality parameters were constantly monitored and maintained at pH 8,4±0,3 and 57.3% ± 7.4 of dissolved oxygen. During the experimental period, diets containing 0, 10, 20 and 30% of LBC were given twice daily (8:30 a.m., 4:30 p.m.), considering quadruplicate for each diet.

After 30 days of experimental period, juveniles were submitted to food restriction for an earlier period of 24 hours and eight juveniles of each treatment were anesthetized with benzocaine (0.05 g/L). Blood samples were collected from the caudal vessel for further hematological analysis. All procedures carried out during the research project were approved by the Ethics Committee on Animal Use - CEUA of the "Luiz de Queiroz" College of Agriculture (ESALQ / USP), protocol no. 2015-13.

LOW OXYGENATION EXPERIMENTAL DESIGN

Juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) were stocked for 15 days in 40 liters cages, distributed into five 1000 liters tanks. Each tank consisted of four cages with six animals, each receiving one of the four treatments (0, 10, 20 and 30% LBC), which were given twice daily (8:30 a.m., 16:30 p.m.). Each tank was considered as a random block. The water quality parameters was monitored constantly and kept adequate: pH 8.1 ± 0.3 and $63.8 \pm 10.7\%$ of oxygen dissolved.

At 15 days of experimental period, juveniles were submitted to food restriction for a period of 24 hours. The water dissolved oxygen was gradually reduced to the value of 0.75 mg/L and, then, ten juveniles of each treatment were anesthetized with benzocaine (0.05 g/0L of water) and blood samples were collected from the caudal vessel for further laboratory analysis. All procedures carried out during the research project were approved by the Ethics Committee on Animal Use - CEUA of the "Luiz de Queiroz" College of Agriculture (ESALQ / USP), protocol no. 2016-08.

GROWTH PERFORMANCE

Juveniles of all cages and both experimental design were measured and weighted at the beginning and end of the experimental period. The following parameters were evaluated:

- 1 Weight gain - WG (g) = Final biomass - Initial biomass;
- 2 Relative weight gain - RWG (%) = $100 \times (\text{Final biomass} - \text{Initial biomass}) / \text{Initial biomass}$;
- 3 Feed intake - FI = Feed intake (FI) per cage;
- 4 Feed conversion ratio – FCR = FI (g) / WG;
- 5 Specific growth rate – SGR (% day⁻¹) = $100 \times [(\ln \text{ final biomass weight} - \ln \text{ initial biomass weight}) \text{ days}^{-1}]$;
- 6 Survival – S = (total number of final fish / total number of initial fish) x 100.

HEMATOLOGICAL ANALYSES

All analyzes related to hematology followed procedures described by Ranzani-Paiva et al. (2013). Aliquots of blood collected in tubes with EDTA were diluted in sodium formaldehyde solution (1:200) and the number of red blood cell was counted in a Neubauer chamber under an optical microscope. The result are expressed as erythrocytes/ μL . The hematocrit value was determined by the microhematocrit method and is expressed as a percentage of red blood cells in relation to whole blood. The hemoglobin (Hb) was determined by the hemoglobin cyanide method (HiCN), a colorimetric end-point reaction system, where the reading was done on a spectrophotometer adjusted to 540 nm. The result is expressed in g.dL^{-1} . The hematimetric variables such as mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were determined according to Wintrobe (1934) using the following calculations:

$$1 \text{ Mean corpuscular volume – MCV} = (\text{hematocrit} \times 10) / \text{erythrocyte};$$

$$2 \text{ Mean corpuscular hemoglobin – MCH (pg)} = (\text{hemoglobin} \times 10) / \text{erythrocyte};$$

$$3 \text{ Mean corpuscular hemoglobin concentration – MCHC (g dL}^{-1}\text{) – (hemoglobin} \times 100) / \text{hematocrit}.$$

The total count of leukocytes and thrombocytes was made from slides with blood extensions of each animal, which were air dried and stained by the modified Rosenfeld (1947) method, according to Tavares-Dias & Moraes (2003), composed of methylene blue eosin according to May-Grunwald, methylene blue eosin according to Giemsa, methylene blue eosin according to Wrigth and methanol. The slides were subsequently analyzed under a light microscope and the cell counting was done by indirect method from the Martins et al. (2004):

$$1 \text{ Leukocytes (/}\mu\text{L)} = (\text{number of leukocytes} \times \text{total number of erythrocytes (/}\mu\text{L)}) / 2000 \text{ erythrocytes counted in the blood extension};$$

$$2 \text{ Trombocytes (/}\mu\text{)} = (\text{number of trombocytes} \times \text{total number of erythrocytes (/}\mu\text{L)}) / 2000 \text{ erythrocytes counted in the blood extension};$$

The differential counting of the defense cells was performed from the blood extensions of each fish. Two hundred cells were counted for each fish and the result was expressed as a percentage of each cell type (lymphocyte, neutrophil, monocyte, eosinophil and special granulocyte cell). The absolute number of each cell type was calculated relative to the total number of leukocytes, which was expressed in number of cells per μL of blood.

STATISTICAL ANALYSES

For the chronic stress experiment, juvenile pacu were distributed in a completely randomized experimental design with four treatments. For the acute stress experiment, pacu juveniles were distributed in a completely randomized block design. All data were submitted to analysis of variance, using the "General Linear Model" procedure (PROC GLM) of the statistical program SAS (1989). Differences between means were evaluated using the Tukey method. For all analyzes, the probability of 5% ($P < 0.05$) was considered.

RESULTS

HIGH STOCKING DENSITY EXPERIMENTAL DESIGN

The inclusion of LBC did not affected the performance parameters analyzed ($P > 0.05$), neither the hematological values ($P > 0.05$), Tables III and IV.

LOW OXYGENATION EXPERIMENTAL DESIGN

Performance parameters for fish fed diets containing 0, 10, 20 or 30% of lyophilized bovine colostrum are presented in Table V. There was a significant difference between the treatments regarding the food consumption parameter ($P < 0.05$), juveniles fed diet containing 10% of LBC showed lower consumption than juveniles fed 20% of CBL.

Hematological parameters of juvenile pacu fed with LBC and subjected to low oxygenation are show in Table VI. The number of leukocytes, monocyte and special granulocyte cell were affected by the diet ($P < 0.05$), juveniles fed 30% LBC showed higher number of leukocytes and monocytes than ones fed 20%LBC and juveniles fed 10% LBC showed higher number of special granulocyte cells than ones fed 20% LBC.

DISCUSSION

The nutritional status of the fish, in addition to genetic and environmental factors, can be considered the aspect that most influences the immune response, modulating resistance to infection. Dietary immunostimulants may help in the defense against infections, however, there is much to know about the treatment period, optimal dose and route of administration in several fish species (Mulero et al., 1998; Sink & Lochmann, 2014). Some components found in bovine

colostrum may act as immunostimulants, since studies demonstrate the action at serum level of components found in bovine colostrum acting to reduce the negative effects of stress (Sakai et al., 1993; Kakuta et al., 1998). Oral administration of bovine lactoferrin to rainbow carp and trout kept under stressful environmental conditions, such as hypoxia and bacterial infection, led to decreased levels of glucose, cortisol, catecholamines and hematocrit, as well as increased phagocytic activity in relation to animals that did not receive the compound in the diet, resulting in a significant decrease in the negative effects of stress on these fish (Kakuta et al., 1998; Sakai et al., 1993). In addition, the antioxidant factors present in bovine colostrum may act to reduce the oxidative effects caused by stress. Vitamins C and E are one of these factors found in colostrum that are well studied for their effectiveness in improving the immune system. When administered in high doses to different species of fish, they resulted in a significant improvement in immunity, by increasing the phagocytic activity, complement system, macrophages and improving the oxidative burst of the defense cells (Anbarasu & Chandran, 2001; Gabaudan & Verlhac, 2000; Lin et al., 2004, Lin & Shiau, 2005; Ai et al., 2006; Azad et al., 2007; Misra et al., 2007).

In the present study, the presence of colostrum in the diet did not affect the serum elements evaluated in juvenile pacu. There is the possibility that bioactive molecules present in this lacteal secretion did not reach the bloodstream. Sado et al. (2013), working with different levels of vitamin E supplementation in pacus diet (25, 50, 150, 300 and 600 mg / kg diet), one of the antioxidant compounds present in bovine colostrum, did not observe differences in the total number of leukocyte, as well as in the present study. Kiron et al. (2004), working with inclusion of 1000mg / kg of this vitamin in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) also did not observe differences in the serum variables analyzed, when compared with the animals that did not receive the compound. Vitamin E, when administered in the diet of fish kept in acute or chronic stress situations, had a significant effect only in animals that were kept under acute stress, which presented a slight increase in immunomodulation (Montero et al., 2001). Therefore, it is suggested that the levels of this antioxidant vitamin, as well as of the other antioxidant compounds present in the diets containing colostrum provided in the present study, may not have been sufficient to cause an immunomodulation effect.

Considering that colostrum, a heterologous animal protein source, did not influence growth and hematological performance, the supply of this innovative substance to fish, which is surplus in milk-producing regions is still possible. In an intensive aquaculture system, as for most animal production systems, food represents more than 50% of the operational cost, with

protein being the most expensive element (El-Sayed, 1999). Fish-meal is the source of protein traditionally used in the formulation of fish diets which, in addition to being costly (Tacon, 1993; El-Sayed, 1999), has the problem of causing environmental damage (Tsukamoto & Takahashi, 1992). Thus, the search for alternatives that may diminish or even replace its use in the formulation of rations is of great importance for fish farming.

References

- Ai, Q. H., Mai, K. S., Tan, B. P., Xu, W., Zhang, W. B., Ma, H. M. & Liufu, Z. G. (2006). Effects of dietary vitamin C on survival, growth, and immunity of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Aquaculture* **261**, 327-336.
- Alcorn, S. W., Pascho, R. J., Murray, A. L. & Shearer, K. D. (2003). Effects of ration level on immune functions in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture* **217**, 529-545.
- Anbarasu, K. & Chandran, M. R. (2001). Effect of ascorbic acid on the immune response of the catfish, *Mystus gulio* (Hamilton), to different bacterins of *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* **11**, 347-355.
- Azad, I. S., Dayal, J. S., Poornima, M. & Ali, S. A. (2007). Supra dietary levels of vitamins C and E enhance antibody production and immune memory in juvenile milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal) to formalin-killed *Vibrio vulnificus*. *Fish & Shellfish Immunology* **23**, 154-163.
- Bonga, S. W. (1997). The stress response in fish. *Physiological reviews* **77**, 591-625.
- Boudry, C. & Thewis, A. (2009). Bovine colostrum as a natural growth factor for newly-weaned piglets: a review. *Bulletin of UASVM Animal Science and Biotechnologies* **66**, 1-2.
- Davis, K. B., Griffin, B. R. & Gray, W. L. (2002). Effect of handling stress on susceptibility of channel catfish *Ictalurus punctatus* to *Ichthyophthirius multifiliis* and channel catfish virus infection. *Aquaculture* **214**, 55-66.
- El-Sayed, A.-F. M. (1999). Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. *Aquaculture* **179**, 149-168.

- Fletcher, G. (1975). The effects of capture, "stress," and storage of whole blood on the red blood cells, plasma proteins, glucose, and electrolytes of the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Canadian Journal of Zoology* **53**, 197-206.
- Gabaudan, J., Verlhac, V. & Dabrowski, K. (2000). Critical review of the requirements of ascorbic acid in cold and cool water fishes (salmonid, percids, plecoglossids and flatfishes). *Ascorbic Acid in aquatic organisms: Status and perspectives*, 33.
- Harris, J. & Bird, D. J. (2000). Modulation of the fish immune system by hormones. *Veterinary immunology and immunopathology* **77**, 163-176.
- Houston, A., Roberts, W. & Kennington, J. (1996). Hematological response in fish: pronephric and splenic involvements in the goldfish, *Carassius auratus* L. *Fish Physiology and Biochemistry* **15**, 481-489.
- Iwama, G. K. (1998). Stress in fish. *Annals of the New York Academy of Sciences* **851**, 304-310.
- Kakuta, I. (1998). Reduction of stress response in carp, *Cyprinus carpio* L., held under deteriorating environmental conditions, by oral administration of bovine lactoferrin. *Journal of fish diseases* **21**, 161-167.
- Kiron, V., Puangkaew, J., Ishizaka, K., Satoh, S. & Watanabe, T. (2004). Antioxidant status and nonspecific immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed two levels of vitamin E along with three lipid sources. *Aquaculture* **234**, 361-379.
- Lin, M. F. & Shiau, S. Y. (2004). Requirements of vitamin C (L-ascorbyl-2-monophosphate-Mg and L-ascorbyl-2-monophosphate-Na) and its effects on immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture nutrition* **10**, 327-333.
- Lin, M. F. & Shiau, S. Y. (2005). Dietary L-ascorbic acid affects growth, nonspecific immune responses and disease resistance in juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture* **244**, 215-221.
- Misra, C. K., Das, B. K., Mukherjee, S. C. & Pradhan, J. (2007). Effects of dietary vitamin C on immunity, growth and survival of Indian major carp, *Labeo rohita*, fingerlings. *Aquaculture Nutrition* **13**, 35-44.
- Montero, D., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J. M. & Izquierdo, M. S. (2001). Low vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Fish & Shellfish Immunology* **11**, 473-490.

- Mulero, V., Esteban, M. A., Munoz, J. & Meseguer, J. (1998). Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* **8**, 49-62.
- Paiva, M. J. T. R., de Pádua, S. B., Tavares-Dias, M. & Egami, M. I. (2013). *Métodos para análise hematológica em peixes*: Editora da Universidade Estadual de Maringá-EDUEM.
- Pandey, N., Dar, A., Mondal, D. & Nagaraja, L. (2011). Bovine colostrum: a veterinary nutraceutical. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health* **3**, 31-35.
- Pavanelli, G., Eiras, J., Takemoto, R., Ranzani-Paiva, M. & Magalhaes, A. (2000). Sanidade de peixes, rãs, crustáceos e moluscos. *Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável*. CNPq, Brasília, 197-246.
- Sado, R. Y., Bicudo, A. J. A. & Cyrino, J. E. P. (2013). Growth and hematology of juvenile pacu, *Piaractus mesopotamicus*, (Holmberg 1887) fed with increasing levels of vitamin E (DL-alpha-tocopheryl acetate). *Anais Da Academia Brasileira De Ciências* **85**, 385-393.
- Sakai, M., Otubo, T., Atsuta, S. & Kobayashi, M. (1993). Enhancement of resistance to bacterial infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), by oral administration of bovine lactoferrin. *Journal of Fish Diseases* **16**, 239-247.
- Schep, L. J., Tucker, I. G., Young, G., Ledger, R. & Butt, A. G. (1999). Controlled release opportunities for oral peptide delivery in aquaculture. *Journal of Controlled Release* **59**, 1-14.
- Sink, T. D. & Lochmann, R. T. (2014). The effects of soybean lecithin supplementation to a practical diet formulation on juvenile channel catfish, *Ictalurus punctatus*: growth, survival, hematology, innate immune activity, and lipid biochemistry. *Journal of the World Aquaculture Society* **45**, 163-172.
- Tacon, A. (1997). Contribution to food fish supplies. *FAO Fisheries Circular*, 17-21.
- Tavares-Dias, M., Schalch, S. & Moraes, F. (2003). Hematological characteristics of Brazilian teleosts. VII. Parameters of seven species collected in Guariba, São Paulo State, Brazil. *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo* **29**, 109-115.
- Tort, L., Balasch, J. & Mackenzie, S. (2003). Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunologia* **22**, 277-286.

- Tsukamoto, R. & Takahashi, N. (1992). Falta de proteína para ração: estrangulamento da aquicultura no Brasil. *Panorama da Aquicultura* **14**, 8-9.
- Verschuere, L., Heang, H., Criel, G., Sorgeloos, P. & Verstraete, W. (2000). Selected Bacterial Strains *ProtectArtemia* spp. from the Pathogenic Effects of *Vibrio proteolyticus* CW8T2. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 1139-1146.
- Wintrobe, M. M. (1934). Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia haematology* **51**, 32.

TABLES

Table I. Chemical composition of lyophilized bovine colostrum.

Chemical composition (g kg ⁻¹)	
Dry matter	910.2
Crude protein	312.8
Fat	55.9
Crude Fiber	7.7
Gross energy (MJ/kg)	16.8

Table II. Composition of diets containing 0, 10, 20 and 30% inclusion of lyophilized bovine colostrum (LBC).

Ingredients (g kg ⁻¹)	0% LBC	10% LBC	20% LBC	30% CBL
Bovine colostrum	-	100	200	300
Albumin	202	183.5	120	58.2
Gelatin	150	94.7	79	60
Starch	465.8	456.5	435	425
Soy oil	80	53	37	14
Dicalcium phosphate	25	31.7	47.5	59.4
Cellulose	66	69	69	70
Tryptophan	-	0.4	1.3	2.2
BHT	0.2	0.2	0.2	0.2
Premix ¹	10	10	10	10
NaCl	1	1	1	1
Chemical composition (g kg ⁻¹)				
Dry matter	921	919	914	910
Crude protein	313	313	315	313
Crude fiber	4	7	10	8
Fat	90	72	65	56
Gross energy (MJ kg ⁻¹)	18.2	17.9	17.4	16.8

Guabi Nutrição Animal, Campinas, São Paulo (ingredient per kg). Vitamins: A, 2,500 UI; D3, 600.000 UI; E, 37.500 UI; K3, 3,750 mg; C, 50,000 mg; B1, 4.000 mg; B2, 4,000 mg; B6, 4,000 mg; B12, 4,000 mg; calcium pantothenate, 12,000 mg; biotin, 15 mg; acid folic, 1,250 mg; niacin, 22,500 mg. Mineral: Cu, 2,500 mg; Zn, 12,500 mg; I, 375 mg; Se, 87.5 mg; Co, 125 mg; Mn, 12,500 mg; Fe, 15,000 mg; BHT, 15,000 mg.

Table III. Performance parameters of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fed with 0, 10, 20 and 30% of lyophilized bovine colostrum and subjected to high stocking density (50 kg fish/m³), mean $\pm$ standard error.

Performance	Diet ¹				P-value
	0 % LBC	10% LBC	20% LBC	30% LBC	
Initial biomass (g)	1.604 $\pm$ 29	1.624 $\pm$ 21	1.604 $\pm$ 15	1.604 $\pm$ 39	NS
Final biomass (g)	1.773 $\pm$ 52	1.783 $\pm$ 59	1.806 $\pm$ 42	1.785 $\pm$ 55	NS
Weight gain (g)	169 $\pm$ 46	159 $\pm$ 51	201 $\pm$ 49	181 $\pm$ 26	NS
Relative weight gain (%)	11 $\pm$ 3	10 $\pm$ 3	13 $\pm$ 3	11 $\pm$ 2	NS
Feed intake (g)	533 $\pm$ 46	547 $\pm$ 60	538 $\pm$ 66	554 $\pm$ 54	NS
Feed conversion ratio (%)	3 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	3 $\pm$ 0,4	3 $\pm$ 0,2	NS
Specific growth rate (%)	0,4 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	NS
Survival (%)	100	100	100	100	

NS – not significant, $P > 0.05$.

¹0% LBC – juvenile pacu fed diets containing 0% of lyophilized bovine colostrum; 10% LBC - juvenile pacu fed diets containing 10% of lyophilized bovine colostrum; 20% LBC - juvenile pacu fed diets containing 20% of lyophilized bovine colostrum; 30% LBC - juvenile pacu fed diets containing 30% of lyophilized bovine colostrum.

Table IV. Hematological parameters of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fed with 0, 10, 20 and 30% of lyophilized bovine colostrum and subjected to high stocking density (50 kg fish/m³), mean $\pm$ standard error.

Hematological parameters	Diet ¹				P-value
	0 % LBC	10% LBC	20% LBC	30% LBC	
Erythrocytes (10 ⁶ /μL)	1.8 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.2	NS
Hematocrit (%)	31 $\pm$ 2	33 $\pm$ 1	33 $\pm$ 1.4	32.9 $\pm$ 2.5	NS
Hemoglobin (g/dL)	7.8 $\pm$ 0.5	7.7 $\pm$ 0.2	7.7 $\pm$ 0.4	7.4 $\pm$ 0.2	NS
MCV (fL)	174 $\pm$ 13	170 $\pm$ 8	180.0 $\pm$ 17.3	175.5 $\pm$ 9.3	NS
MCH (pg/cel)	43 $\pm$ 4	39 $\pm$ 3	42.0 $\pm$ 5.0	40.0 $\pm$ 6.0	NS
MCH C (g/dL)	25 $\pm$ 1	23 $\pm$ 1	23.3 $\pm$ 0.7	20.6 $\pm$ 6.0	NS
Leukocytes (10 ³ /μL)	10 $\pm$ 1	14 $\pm$ 0.1	10 $\pm$ 0.1	16 $\pm$ 0.3	NS
Lymphocyte/μL	496 $\pm$ 246	426 $\pm$ 276	991 $\pm$ 656	850 $\pm$ 218	NS
Monocyte/μL	621 $\pm$ 313	372 $\pm$ 327	864 $\pm$ 280	1.154 $\pm$ 617	NS
Neutrophil/μL	1,858 $\pm$ 1,181	1,078 $\pm$ 996	1,298 $\pm$ 460	1,538 $\pm$ 1,364	NS
Special granulocyte cell/μL	304 $\pm$ 115	138 $\pm$ 93	338 $\pm$ 246	209 $\pm$ 117	NS
Eosinophil/μL	9 $\pm$ 11	2 $\pm$ 4	2 $\pm$ 4	5 $\pm$ 10	NS
Trombocytes (10 ³ /μL)	127 $\pm$ 8	108 $\pm$ 10	138 $\pm$ 2	155 $\pm$ 15	NS

NS – not significant, P>0.05.

¹0% LBC – juvenile pacu fed diets containing 0% of lyophilized bovine colostrum; 10% LBC - juvenile pacu fed diets containing 10% of lyophilized bovine colostrum; 20% LBC - juvenile pacu fed diets containing 20% of lyophilized bovine colostrum; 30% LBC - juvenile pacu fed diets containing 30% of lyophilized bovine colostrum.

Table V. Performance parameters of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fed with 0, 10, 20 and 30% of lyophilized bovine colostrum and subjected to low oxygenation, mean $\pm$ standard error.

Performance	Diet ¹				P-value
	0 % LBC	10% LBC	20% LBC	30% LBC	
Initial biomass (g)	698 $\pm$ 42	718 $\pm$ 44	787 $\pm$ 80	773 $\pm$ 36	NS
Final biomass (g)	748 $\pm$ 51	774 $\pm$ 49	854 $\pm$ 87	848 $\pm$ 19	NS
Weight gain (g)	50 $\pm$ 13	56 $\pm$ 22	64 $\pm$ 16	75 $\pm$ 28	NS
Relative weight gain (%)	7.1 $\pm$ 1.6	7.8 $\pm$ 3.1	8.2 $\pm$ 1.8	9.9 $\pm$ 3.9	NS
Feed intake (g)	96 $\pm$ 34ab	85 $\pm$ 42b	123 $\pm$ 13a	105 $\pm$ 35ab	*
Feed conversion ratio (%)	2,1 $\pm$ 1.2	1.7 $\pm$ 0.8	2,0 $\pm$ 0,5	1.7 $\pm$ 1.1	NS
Specific growth rate (%)	0.26 $\pm$ 0.06	0.28 $\pm$ 0.1	0.29 $\pm$ 0.06	0.35 $\pm$ 0.13	NS
Survival (%)	100	100	100	100	

NS – not significant, $P > 0.05$; * $P < 0.05$; Different letter (a, b) in the same row differ, $P < 0.05$;

¹0% LBC – juvenile pacu fed diets containing 0% of lyophilized bovine colostrum; 10% LBC - juvenile pacu fed diets containing 10% of lyophilized bovine colostrum; 20% LBC - juvenile pacu fed diets containing 20% of lyophilized bovine colostrum; 30% LBC - juvenile pacu fed diets containing 30% of lyophilized bovine colostrum.

Table VI. Hematological parameters of juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fed with 0, 10, 20 and 30% of lyophilized bovine colostrum and subjected to low oxygenation, mean $\pm$ standard error.

Hematological parameters	Diet ¹				P-value
	0 % LBC	10% LBC	20% LBC	30% LBC	
Erythrocytes (10 ⁶ /μL)	1.4 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.6	1.1 $\pm$ 0.5	1.6 $\pm$ 0.2	NS
Hematocrit (%)	27 $\pm$ 9	27 $\pm$ 11	25 $\pm$ 8	32 $\pm$ 2	NS
Hemoglobin (g/dL)	6.6 $\pm$ 0.9	7.6 $\pm$ 1.1	6.2 $\pm$ 1.6	7.4 $\pm$ 1.1	NS
MCV (fL)	191 $\pm$ 25	179 $\pm$ 31	262 $\pm$ 99	202 $\pm$ 24	NS
MCH (pg/cel)	49 $\pm$ 11	63 $\pm$ 38	69 $\pm$ 38	47 $\pm$ 4	NS
MCH C (g/dL)	27 $\pm$ 10	38 $\pm$ 27	30 $\pm$ 14	24 $\pm$ 3	NS
Leukocytes (10 ³ /μL)	2,8 $\pm$ 0,8 ab	3,2 $\pm$ 1,5 ab	1,9 $\pm$ 1,0 b	3,7 $\pm$ 1,3 a	*
Lymphocyte/μL	462 $\pm$ 406	742 $\pm$ 471	400 $\pm$ 314	576 $\pm$ 521	NS
Monocyte/μL	433 $\pm$ 108 ab	451 $\pm$ 188 ab	308 $\pm$ 229 b	809 $\pm$ 425 a	*
Neutrophil/μL	1,484 $\pm$ 1.100	1,396 $\pm$ 840	902 $\pm$ 578	1,931 $\pm$ 860	NS
Special granulocyte cell/μL	365 $\pm$ 107 ab	595 $\pm$ 367 a	271 $\pm$ 110 b	391 $\pm$ 141 ab	*
Eosinophil/μL	13 $\pm$ 10	10 $\pm$ 6	8 $\pm$ 5	12 $\pm$ 16	NS
Trombocytes (10 ³ /μL)	24 $\pm$ 1	23 $\pm$ 13	20 $\pm$ 15	20 $\pm$ 1	

NS – not significant, P>0.05; *P<0.05; Different letter (a,b) in the same row differ, P<0.05;

¹0% LBC – juvenile pacu fed diets containing 0% of lyophilized bovine colostrum; 10% LBC - juvenile pacu fed diets containing 10% of lyophilized bovine colostrum; 20% LBC - juvenile pacu fed diets containing 20% of lyophilized bovine colostrum; 30% LBC - juvenile pacu fed diets containing 30% of lyophilized bovine colostrum.